

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Análisis de la deficiencia de la DNA
polimerasa μ en la unión de extremos no
homólogos. Implicaciones en
envejecimiento y desarrollo tumoral.**

Memoria de Tesis Doctoral
presentada por **Beatriz Escudero González**
para optar al grado de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid.

Directores de Tesis:
Antonio Bernad Miana
Enrique Samper Rodríguez

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
Instituto de Salud Carlos III



La memoria con título “**Análisis de la deficiencia de la DNA polimerasa mu en la unión de extremos no homólogos. Implicaciones en envejecimiento y desarrollo tumoral.**” ha sido realizada por Beatriz Escudero González para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Bajo la dirección y tutela del Dr. Antonio Bernad Miana y la codirección del Dr. Enrique Samper Rodríguez, el trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología (DIO) del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) y el Departamento de Cardiología Regenerativa del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC-ISCIII).

Para que conste a todos los efectos que este trabajo reúne la calidad científica que exige una Tesis Doctoral, firman la presente certificación:

Dr. Antonio Bernad Miana
Rodríguez

Dr. Enrique Samper

Madrid, 20 de Diciembre de 2010
de 2010

Madrid, 20 de Diciembre

Agradecimientos.

Es difícil reflejar en pocas líneas mi gratitud con todas las personas que han hecho posible este trabajo. Llevo ya más de 5 años en el laboratorio, y 5 años dan para muchas relaciones personales y laborales. Pero haré un esfuerzo por no enrollarme, sin dejarme a nadie en el tintero.

Empezaré por mis jefes, como manda el protocolo. En primer lugar, quiero darle las gracias a Antonio Bernad, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por guiarme a lo largo de estos años y, especialmente, por haberse implicado enormemente en la escritura de este trabajo. Sus mails los sábados de madrugada siempre me han dado un poco de miedo, pues se supone que el empleado nunca suelta el lápiz antes que el jefe. Sin embargo, han sido una vital aportación a la hora de sintetizar tantos años de trabajo en unas cuantas páginas. En segundo lugar, y no menos importante, quisiera mencionar a Enrique, mi “mentor”. A él debo la mayor parte de los conocimientos adquiridos a lo largo de estos años. Pero no sólo me ha enseñado, sino que me ha apoyado cuando lo he necesitado, tanto en el plano laboral como en el personal. Ha sabido liderar y, a su vez, ser uno más, algo que no todo el mundo sabe hacer.

Entre las personas que han trabajado conmigo, quisiera mencionar especialmente a Candelas, por su voluntad incasable, su disponibilidad incuestionable, y los ratos de cháchara en su mesa. Es realmente agradable trabajar con alguien con tantas ganas de ayudar, y que, además, te hace amenos los minutos entre incubación e incubación. En este aspecto, también quisiera dar las gracias a Rosa, porque este último año hubiera sido imposible sin ella, siempre al pie del cañón; a Vane, por todas las horas invertidas en el microtomo con mis muestras, a Carmen, que ha sido mi libro de consulta día tras día, además de que hemos colaborado en este proyecto y me ha echado un cable en más de una ocasión; y a Yaima, la reina de las hibridaciones *in situ*, por su ayuda cuando no me llegaban 2 manos, especialmente en los últimos meses.

También quisiera dar las gracias a la gente del servicio de citometría, y muy especialmente, a José Manuel Ligos, por su tiempo, sus conocimientos y su amabilidad. Y, como no, a Antonio Molina, por realizar el examen patológico de mis muestras, y a Roisin y Ana, por convertir en preparaciones analizables aquellos bloques de parafina que a mí me resultaban imposibles de procesar.

Yendo a un plano más personal que laboral, quisiera dar las gracias al grupillo que hace que el día a día en el laboratorio no sea sólo trabajo: Alberto, Isa, Vane, Nines, Paco, Íñigo, Rosa y Aída. Con todos ellos he compartido muy buenos momentos: el café por las mañanas, las comidas y las cañitas y salidas nocturnas. También a Lupe, que aunque sólo ha estado yendo y viniendo, parece que lleva en el labo toda la vida. Todos ellos han pasado a ser más que compañeros para mí. Pero quisiera hacer una mención especial a Alberto. Empezamos en el laboratorio prácticamente a la vez, y, desde entonces, día

tras día, mano a mano. No me imagino qué hubiese sido de mí sin él en los primeros momentos, cuando llegaba a un sitio nuevo, en una ciudad nueva y con nuevos compañeros de trabajo. Y creo que esos momentos nos han unido desde entonces, pese a que somos como el agua y el aceite (especialmente, en los gustos musicales).

Me gustaría también mostrar mi agradecimiento de modo general a la gente del laboratorio y del departamento, incluyendo de manera especial a los que se han mudado a otra planta, por el ambiente que se respira a diario. Da gusto venir a trabajar estando rodeada de gente así.

Todos estos años en el laboratorio me han aportado una experiencia invaluable, pero, como supongo que todo científico piensa, se pasan momentos difíciles y frustrantes. Y no hubiera sido capaz de superarlos sin mis compañeros ni sin Enrique. Pero tengo que dar las gracias a una serie de personas completamente ajenas al mundo de la ciencia:

- A Andrea y María, que han seguido de cerca mis quejas y mis alegrías. Tanto me han escuchado, que ya saben que se puede hacer, sin magia, que un ratón desarrolle tumores de forma espontánea (aunque seguro que no lo dirían así).

- A Julia y a Almu, que, aunque han estado por el mundo a delante gran parte del tiempo, están al día de mis pasos. Bueno, no tan al día, porque se creen que soy casi una Einstein, y, obviamente, no es para tanto.

- A Dani, Mónica, Jesús y Laura, por estar siempre pendientes y hacerme pasar tan buenos ratos.

- A “los niños”, como les llamo desde que tenía 10 años, por ser mis amigos, por ridiculizar mis “actividades en el animalario” con tal de echarse unas risas, por intentar mostrar interés cuando les cuento algo sobre un experimento, porque, en realidad, sé que no les importa en absoluto.

- A mi familia; por eso, por ser MI FAMILIA, de la que no me puedo sentir más orgullosa. Pero, sin ánimo de hacer de menos a los demás, tengo que darle las gracias a mi madre. ¿Por qué? Por ser mi madre, mi confidente, mi amiga y mi guía. Sin ella, todo hubiese sido mucho más difícil.

- Y a Neil, por ser ... TODO. Él sí que sabe ciencia, y sólo de ESCUCHAR todo lo que yo le cuento. Porque es mi compañero, mi mejor amigo y mi marido, y nadie lo haría mejor que él.

GRACIAS A TODOS POR HABER HECHO POSIBLE ESTE MOMENTO.

Índice

ÍNDICE.....	1
SUMMARY	7
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN.....	17
I. Daños en el DNA y su reparación	19
A. Roturas de una sola hebra	19
B. Roturas de doble hebra.....	21
Mecanismos de reparación	21
1. Recombinación homóloga	22
2. Unión de extremos no homólogos	23
NHEJ en el desarrollo de linfocitos	24
Recombinación V(D)J	24
Hipermutación somática y recombinación de cambio de clase	27
Actividad polimerasa en NHEJ	28
II. Mecanismos celulares de prevención y respuesta a daño.	
P53 y su respuesta central ante roturas de doble hebra	32
Regulación de p53	33
Senescencia mediada por p53.....	33
Apoptosis mediada por p53	34
III. Envejecimiento como consecuencia de daño en el DNA.....	36
Daño en el DNA, senescencia y envejecimiento	37
IV. Modelos para el estudio de la función de la DNA polimerasa μ	
en la reparación de roturas de doble hebra	39
Ratón deficiente en pol μ	39
Ratón deficiente en p53	40
1. Tumorigénesis	40
2. Defectos en el tubo neural	41
Ratón deficiente en pol μ y p53.....	41
OBJETIVOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
I. Modelos animales	49
II. Líneas celulares.....	49
1. Ramos	49
2. CHO.....	49
3. MEFs.	50
4. Linfocitos B	50
5. Médula ósea.....	51
III. Técnicas experimentales	51
1. Genotipado	51
1.1. Genotipado para pol μ	51
1.2. Genotipado para p53	51
2. Determinación del sexo en embriones.....	52
3. <i>Western blot</i>	52

4. Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	52
4.1. FISH telomérico	53
4.2. <i>Painting</i> cromosómico	53
5. Citometría de flujo (FACS)	54
5.1. Análisis de ROS	54
5.2. Análisis de ciclo celular	54
5.3. Análisis de poblaciones de linfocitos.....	54
6. Inmunofluorescencia para la detección de γ H ₂ AX	55
7. <i>Sister chromatid exchange</i> (SCE).....	55
8. <i>Arrays</i> de expresión	55
9. Irradiación de células y animales.....	56
10. PCR cuantitativa a tiempo real	56
11. Túnel	57
12. <i>Arrays</i> de CGH	57
RESULTADOS	59
I. Papel de la DNA polimerasa μ en la reparación de DSBs	61
A. Función de la DNA polimerasa μ en la reparación de extremos no homólogos.	
Papel en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica en condiciones de estrés genotóxico	61
1. Sensibilidad de las células deficientes en pol μ a radiación ionizante	61
2. Sensibilidad de las células deficientes en pol μ a estrés oxidativo.....	69
B. Efecto de la deficiencia en pol μ en la reparación por recombinación homóloga	77
1. SCE en líneas celulares	78
2. SCE en células primarias.....	78
C. Estudio del envejecimiento en tejidos en ausencia de pol μ	80
1. Envejecimiento en el hígado de ratones $\mu^{-/-}$	80
2. Envejecimiento en el cerebro de ratones $\mu^{-/-}$	86
3. Envejecimiento en el sistema hematopoyético de ratones $\mu^{-/-}$	88
II. Interacción entre POL μ y P53	92
A. Datos previos	92
B. Generación del ratón $\mu^{-/-}$ p53 ^{-/-}	92
C. Caracterización del ratón $\mu^{-/-}$ p53 ^{-/-}	93
1. Caracterización a nivel celular: MEFs $\mu^{-/-}$ p53 ^{-/-}	93
2. Caracterización del embrión $\mu^{-/-}$ p53 ^{-/-}	95
3. Estudio de supervivencia de la colonia μ :p53	97
4. Estudio de tumorigénesis en el ratón $\mu^{-/-}$ p53 ^{-/-}	98

DISCUSIÓN.....	107
Deficiencia en pol μ y sensibilidad a estrés genotóxico.....	107
Impacto de la deficiencia en pol μ en la recombinación homóloga	112
Envejecimiento en el ratón $\mu^{-/-}$	114
Efecto del fondo genético en la función de pol μ	116
Efecto global de la ausencia de pol μ	117
Cooperación entre pol μ y p53	119
Caracterización de los linfomas.....	121
Efecto de la deficiencia de pol μ en el desarrollo de sarcomas en los ratones p53 $^{-/-}$: datos <i>in vitro</i> (MEFs) e <i>in vivo</i> (tumores)	124
Visión global	125
BIBLIOGRAFÍA	131
ANEXO	151
PUBLICACIONES.....	157

Summary

Double strand breaks (DSBs) are the most deleterious form of DNA damage. They can lead to genomic instability and cell death (or senescence), which might eventually cause cancer and aging. Organisms have developed two main strategies to fight against DNA damage: DNA repair mechanisms and cell cycle control checkpoints. Both of them are induced by DNA damage sensors, which activate not only the initiating repair factors but also the central protein in the checkpoints control: the tumor suppressor p53. The levels of activate P53, depend on amount of DNA damage, and determine the outcome of the cellular decision to undergo apoptosis, senescence or continue through the cell cycle. Consistently with the role of p53 in tumor suppression, $p53^{-/-}$ mice are strongly cancer prone and succumb to aggressive thymic lymphomas at an early age.

The two principal mechanisms for DSBs repair are Homologous Recombination (HR) and Non Homologous End Joining (NHEJ). HR is characterized by its fidelity because it makes use of the homologous sequence to repair the damaged DNA. Therefore, HR acts mainly in the G2M phase of cell cycle, where the sister chromatids are available to act as a template. NHEJ is able to act throughout the cell cycle, mainly in S-G1 phases, and does not use large regions of homology to repair DNA breaks. However, this mechanism is more error prone. NHEJ can repair many different types of DSBs, even those that need end processing prior to ligation of the break. In the latter case, a polymerase activity is normally required.

Mice lacking any of the NHEJ core factors (Ku70, Ku80, DNA-PKcs, LigIV, Xrcc4 and XLF) show immunodeficiency due to blocked recombination of gene segments in B and T lymphocytes receptors (a NHEJ mediated process). These mice also exhibit ionizing radiation sensitivity and some of them ($Ku80^{-/-}$ and $DNA-PKcs^{-/-}$) have premature aging phenotypes.

NHEJ deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs) enter senescence prematurely due to persistent DNA damage and chromosomal instability. The combined deficiency of a NHEJ core factor and p53 results in pro-B lymphoma development, due to the survival of chromosomically aberrant lymphocytes, many of which carry specific translocations between the IgH enhancer locus and C-myc .

Polymerase mu ($\text{pol } \mu$) is an error-prone DNA polymerase which belongs to the PolX family. $\text{Pol } \mu$ has high structural similarity to TdT and, like this protein, it has terminal transferase activity. TdT's activity is limited to programmed rearrangements in lymphocyte development. *In vitro*, $\text{pol } \mu$ participates in specific NHEJ reactions that require DNA polymerase activity. The only *in vivo* role of $\text{pol } \mu$ that had been demonstrated before 2009 (when part of the present work was published: Lucas D., Escudero B. et al., 2009) was its requirement for correct recombination of the immunoglobulin k light chain during B cell development. Thus, $\text{pol } \mu$ deficiency results in shorter, non-productive V κ -J κ junctions that lead to lymphocyte cell death at the transition from PreB to immature B cell stage. Unlike TdT, $\text{pol } \mu$ is expressed in many tissues (liver, kidney, lung, brain, testis), suggesting that it might participate in general NHEJ *in vivo*. This fact led us to search for additional functions where $\text{pol } \mu$ could be involved apart from the recombination of immunoglobulin genes.

The $\text{pol } \mu$ deficient mouse ($\mu^{-/-}$) generated in our laboratory has shown reduced numbers of B lymphocytes, but also of neutrophils and platelets. Moreover, this mouse is hypersensitive to ionizing radiation. Strickingly, this mouse model has a phenotype of

delayed aging, as shown, for example, by the extended lifespan and reduced deterioration of brain function with age.

In the present work, we characterize in detail the function of pol μ in general NHEJ pathway, analyzing the effects of its efficiency under stressful conditions in hematopoietic as well as in non hematopoietic cells/tissues. We observed that pol μ deficient primary cells are sensitive to ionizing radiation and that $\mu^{-/-}$ MEFs enter senescence as a consequence of DNA damage and genomic stability generated by stressful culture conditions. We have also characterized, in part, the role of this polymerase in the aging process in mice. Our results indicate that pol $\mu^{-/-}$ aging livers show reduced apoptosis and polyploidy, both related to liver aging. These data are in agreement with the notion that the lack of this polymerase can cause a delay in aging. Moreover, reactive oxygen species (ROS) accumulation, which is a key factor contributing to organism deterioration, was also found to be diminished in $\mu^{-/-}$ thymus and spleen.

To further investigate the function of pol μ in DSBs repair, we generated a double knockout mouse model which combines deficiencies for pol μ and p53. Surprisingly, $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ mice shows reduced incidence of lymphoma compared to p53 $^{-/-}$ mice, but increased incidence of sarcoma, suggesting that pol μ plays a role in non lymphocytic cells. $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ mice have a significantly shorter lifespan than p53 $^{-/-}$ mice. We propose that this phenotype is due to the higher sarcoma incidence. The cooperation between p53 and pol μ in mesodermic tissues is strengthened by our *in vitro* results that indicate that MEFs deficient in both $\mu^{-/-}$ and p53 $^{-/-}$ are more chromosomically unstable than p53 $^{-/-}$ MEFs.

All together, these data demonstrate that pol μ participates in general NHEJ pathway:

- 1) Its absence affects the hematopoietic system and non hematopoietic tissues, as shown by the higher chromosome instability and/or γ H2AX levels in médula ósea, spleen, liver and MEFs $\mu^{-/-}$ under genotoxic stress. This role of pol μ is supported by the fact that the absence of this polymerase promotes sarcomas, conjunctive tissue-derived tumors, in p53 $^{-/-}$ genetic background.
- 2) Pol μ deficiency delays aging, as shown by the increased lifespan and by several “younger” $\mu^{-/-}$ tissues compared to controls. We propose that the lack of pol μ makes the NHEJ pathway less error-prone (probably because pol μ is replaced by other polymerases without transfer terminal activity (i.e. pol λ) but slightly slower and less efficient. In situations of DNA damage, in a pol μ null context, HR repairs some of the breaks with high fidelity and the cells that cannot efficiently repair the damage, are eliminated by apoptosis. We propose that by increasing HR and decreasing mutagenic NHEJ, $\mu^{-/-}$ mice accumulate fewer DNA mutations throughout life, promoting longevity.

Abreviaturas

A-EJ	<i>Alternative End Joining</i>
AID	<i>Activation-Induced Deaminase</i>
Agt	<i>Angiotensinogen</i>
Agtr1a	<i>Angiotensin II receptor, type 1a (AT_{1A})</i>
APAF1	<i>Apoptotic Peptidase Activating Factor 1</i>
APE1	<i>Apurinic/aprimidinic (abasic) Endonuclease 1</i>
APLF	<i>Aprataxin and PNKP (Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase) Like Factor</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia Related</i>
BER	<i>Base Excision Repair</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BID	<i>BH3 Interacting Domain death agonist</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1, early onset</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2, early onset</i>
BRCT	<i>Breast Cancer C-Terminal Domain</i>
CNB	<i>Centro Nacional de Biotecnología</i>
CDK	<i>Cycline-Dependent Kinase</i>
CDC25A	<i>Cell Division Cycle 25 homolog A (S. cerevisiae)</i>
CHK1	<i>CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)</i>
CHK2	<i>CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
C1qa	<i>Complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide</i>
C3a	<i>Complement component 3a</i>
C5a	<i>Complement component 5a</i>
C5l2	<i>C5a like receptor 2</i>
COX2	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i>
CSA	<i>Cockayne síndrome complementation protein A</i>
CSB	<i>Cockayne síndrome complementation protein B</i>
CSR	<i>Class-switch Recombination</i>
Cy3	<i>Cyanin 3 fluorophore</i>
Cy5	<i>Cyanin 5 fluorophore</i>
cDNA	<i>copy DNA from RNA template</i>
DAPI	<i>4,6-diamidino-2-phenilindole</i>
DCFDA	<i>5 (6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihidrofluorescein diacetate acetyl ester</i>
DDIT4l	<i>DNA-Damage-Inducible Transcript 4-like</i>
DHE	<i>Di-hydro ethidium</i>
DIO	<i>Departamento de Inmunología y Oncología</i>
DMEM	<i>Dulbecco modified eagles medium</i>
DNA	<i>DeoxyRibonucleic acid</i>
DNA-PK	<i>DNA protein kinase</i>
DNAPKcs	<i>DNA Protein Kinase Catalic Subunit</i>
DSB	<i>Double Strand Break</i>
ECL	<i>Enzymatic Chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EGLN3	<i>EGL Nine homolog 3 (C. elegans)</i>
ERCC1	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1</i>

EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FEN1	<i>Flap structure-specific endonuclease 1</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GFP	<i>Enhanced green fluorescent protein de Aequorea victoria</i>
GG-NER	<i>Global Genome-NER</i>
GH	<i>Growth hormone</i>
H2AX	<i>H2A histone family, member X</i>
H3	<i>H3 histone family</i>
HEF	<i>Human Embryonic Fibroblast</i>
HEPA	<i>High Efficiency Particulate Air</i>
HEPES	<i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazine)Ethane Sulfonic acid</i>
hHR23B	<i>RAD23 homolog B (S. cerevisiae)</i>
HR	<i>Homologous Recombination</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Ig	<i>Immunoglobulin</i>
IgA	<i>Immunoglobulin A</i>
IgD	<i>Immunoglobulin D</i>
IgE	<i>Immunoglobulin E</i>
IGF	<i>Insulin growth factor</i>
IgG	<i>Immunoglobulin G</i>
IgH	<i>Immunoglobulin Heavy Chain</i>
IgL	<i>Immunoglobulin Light Chain</i>
IgM	<i>Immunoglobulin M</i>
IL3	<i>Interleukin 3</i>
IL4	<i>Interleukin 4</i>
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
KU70	<i>Thyroid autoantigen 70kDa (Ku antigen)</i>
KU80	<i>Thyroid autoantigen 80kDa (Ku antigen)</i>
ligIV	<i>DNA ligase IV</i>
MDM2	<i>Transformed Mouse 3T3 Cell Double Minute 2</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MRE11	<i>Meiotic Recombination 11 Homolog A (S. cerevisiae)</i>
MRN	<i>Complex of MRE11-RAD50-NBS1</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRPL12	<i>Mitochondrial Ribosomal Protein L12</i>
MRPL28	<i>Mitochondrial Ribosomal Protein L28</i>
MTG	<i>Mitotracker Green</i>
MYC	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrina)</i>
NDUFA10	<i>NADH Dehydrogenase Ubiquinone 1 Alpha subcomplex 10</i>
NER	<i>Nucleotide-Excision Repair</i>
NHEJ	<i>Non Homologous End Joining</i>
Nosip	<i>Nitric Oxide Synthase Interacting Protein</i>
Nos3	<i>Nitric Oxide Synthase 3</i>
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature compound</i>

P16	<i>Cdkn2a (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A)</i>
P19	<i>Cdkn2d (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2D)</i>
P21	<i>Cdkn1a (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A)</i>
P53	<i>Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)</i>
PARP1	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase family, member1</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PK1	<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1</i>
PE	<i>Phycoeritrin</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
PGK	<i>Phosphoglycerate kinase</i>
PNA	<i>Peptid Nucleic Acid</i>
PNK	<i>Polynucleotide kinase 3'-phosphatase</i>
Pol	<i>Polimerase</i>
pol μ	<i>DNA polimerase mu</i>
pol λ	<i>DNA polimerase lambda</i>
Polη	<i>DNA polimerase eta</i>
Prcp	<i>Prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C)</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i>
RAD50	<i>RAD50 homolog (S. cerevisiae)</i>
RAD51	<i>RAD51 homolog (S. cerevisiae)</i>
RAD52	<i>RAD52 homolog (S. cerevisiae)</i>
RAD54	<i>Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. Cerevisiae)</i>
RAG 1	<i>Recombination Activating Gene 1</i>
RAG 2	<i>Recombination Activating Gene 2</i>
Rb	<i>Retinoblastoma protein</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation buffer</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPA	<i>Replication Protein A</i>
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute medium 1640</i>
RSS	<i>Recombination SignalSequence</i>
RT	<i>Room Temperature</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase PCR</i>
S	<i>Switch</i>
SCE	<i>Sister Chromatid Exchange</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SHM	<i>Somatic Hypermutation</i>
SPF	<i>Specific patogen free</i>
SSB	<i>Single Strand Breaks</i>
SSC	<i>Sodium chloride-sodium citrate buffer</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
T-CR	<i>Transcription-Coupled Repair</i>
TdT	<i>nucleotidil-transferase terminal</i>
TFIIH	<i>Transcription factor II H</i>
TIMM17a	<i>Translocase of Inner Mitochondrial Membrane 17a</i>

TMRM	<i>Tetramethylrhodamine</i>
TRIS	<i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
VDJ Recombination	<i>Recombination of the V (Variable), D (Diversity) y J (Joining) gene segments</i>
WCP	<i>Whole Chromosome Paint</i>
WRN	<i>Helicasa del síndrome de Werner</i>
XLF	<i>XRCC4 like factor</i>
XP	<i>Xeroderma Pigmentosum</i>
XPA	<i>Xeroderma Pigmentosum, complementation group A</i>
XPB	<i>Xeroderma Pigmentosum, complementation group B</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group C</i>
XPD	<i>Xeroderma Pigmentosum, complementation group D</i>
XPF	<i>Xeroderma Pigmentosum, complementation group F</i>
XPG	<i>Xeroderma Pigmentosum, complementation group G</i>
XRCC1	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1</i>
XRCC2	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2</i>
XRCC4	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4</i>
α-MEM	<i>alpha Minimum Essential Medium</i>
μg	microgramo
ng	nanogramo
mg	miligramo
g	gramo
μL	microL
mL	mililitro
nm	nanómetro
μm	micrómetro (micra)
μM	micromolar
mM	milimolar
M	molar
kDa	kilodalton
Gy	gray, unidad internacional de medida de radiación
rpm	revoluciones por minuto
°C	grado centígrado
aprox	aproximadamente
cols	colaboradores
dpc	después del coito
Fig	figura
ns	no significativo
vs	<i>versus</i>
wt	<i>wild type</i>
X^{-/-}	homocigoto para la delección del gen X (<i>knockout</i>)
X^{+/-}	heterocigoto para la delección del gen X
X^{+/+}	no se ha modificado ninguno de los alelos del gen X (<i>wild type</i>)

Introducción

I. Daños en el DNA y su reparación.

Existe una gran diversidad de lesiones posibles en el ácido desoxirribonucleico (DNA, *Deoxyribonucleic Acid*), siendo las más importantes las roturas de doble hebra (DSBs, *Double Strand Breaks*). Las roturas de una sola hebra (SSBs, *Single Strand Breaks*) originan DSBs si no son reparadas antes de la replicación celular.

Las roturas en el DNA son causadas por dos tipos de fuentes principalmente: 1) factores ambientales, como la radiación ionizante (rayos X o gamma), y 2) factores endógenos, como los radicales libres producto del metabolismo celular o las nucleasas celulares (Lindahl and Wood 1999).

Existen 4 mecanismos principales implicados en la reparación de estas roturas: 1) reparación por excisión nucleotídica (NER, *Nucleotide-Excision Repair*), reparación por excisión de base (BER, *Base Excision Repair*), recombinación homóloga (HR, *Homologous Recombination*) y unión de extremos no homólogos (NHEJ, *Non Homologous End Joining*) (Lindahl and Wood 1999). NER y BER reparan lesiones en una sola hebra, mientras que HR y NHEJ reparan lesiones en la doble hebra.

A) ROTURAS DE UNA SOLA HEBRA.

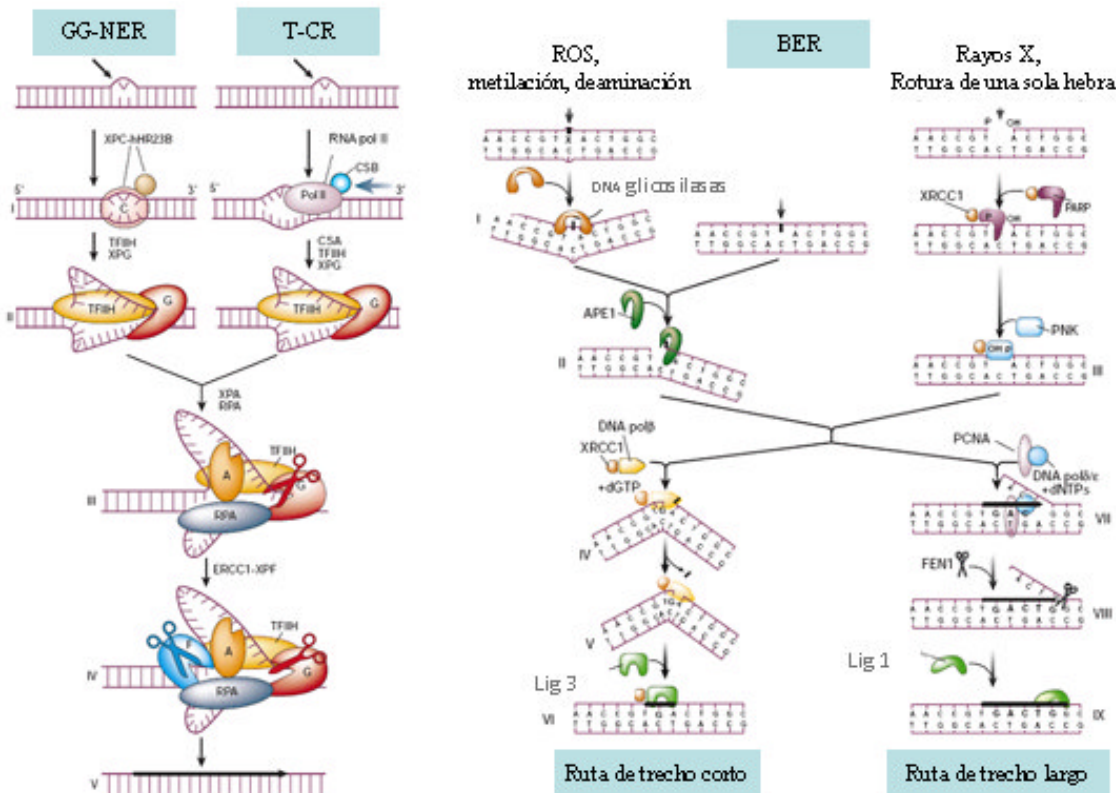
La relevancia de las SSBs se pone de manifiesto en los síndromes que padecen los humanos y modelos murinos deficientes en las vías de reparación de este tipo de roturas. La deficiencia de algunos componentes de la vía de NER provoca hipersensibilidad a la luz del sol (rayos UV), cáncer de piel y envejecimiento prematuro, entre otros síntomas.

La vía NER repara lesiones que distorsionan la geometría de la doble hélice. Esta distorsión interfiere con el apareamiento de bases y obstruye la transcripción y la replicación. Los sustratos de BER son pequeñas modificaciones químicas de las bases nucleotídicas, de ahí su importancia en la mutagénesis. La mayoría de las lesiones sustrato de NER proviene de fuentes exógenas (excepto algún tipo de lesiones oxidativas), mientras que la mayoría de las lesiones reparadas por BER es de origen endógeno. Son lesiones, en ambos casos, que afectan a una sola hebra y que se reparan mediante un mecanismo de “corte y parche”, por el que escinden la lesión (con o sin secuencias flanqueantes) y rellenan el hueco empleando la hebra complementaria como molde.

Hay dos subtipos de NER, con especificidad por el sustrato ligeramente distinta: 1) GG-NER (*Global Genome-NER*), que detecta distorsiones en la doble hebra a lo largo de todo el genoma, y 2) T-CR (*Transcription-Coupled Repair*), que actúa sobre lesiones que bloquean la elongación por los complejos de transcripción (Tornaletti and Hanawalt 1999).

La vía BER también tiene 2 mecanismos de actuación. El principal, *ruta de trecho corto*, repara lesiones de 1-2 nucleótidos. La *ruta de trecho largo* es un mecanismo minoritario que repara daños de 2-10 nucleótidos.

En la figura siguiente se explican los mecanismos NER y BER de forma esquemática (el de *long-patch* se encuentra especialmente resumido, pues es minoritario y complejo) (revisado en (Hoeijmakers 2001)).



Hoeijmakers, 2001

Figura 11. A) Mecanismo esquematizado de la vía NER en sus dos subtipos (GG-NER y TCR). I: Reconocimiento de la lesión: en el mecanismo global, lo lleva a cabo el complejo XPC-hHR23B, pero en TCR el complejo de transcripción recluta a CSB para desplazar a la RNA pol II (van den Boom, Jaspers et al. 2002). II: El factor TFIIH (junto con las helicasas XPB y XPD) abre la hélice y expone la cadena dañada. Además, se reclutan otros factores, como XPG (y CSA, en el caso de TCR). III: Reclutamiento de la helicasa XPA y RPA, que protege la hebra intacta. IV: Incorporación del complejo ERCC1/XPF, que trabaja con la exonucleasa XPG para cortar en las posiciones 3' y 5' de la lesión, respectivamente (Houtsmuller, Rademakers et al. 1999; de Boer and Hoeijmakers 2000; Zhu, Niedernhofer et al. 2003). V: Síntesis de la nueva cadena: En este punto se reclutan a la lesión DNA polimerasas de reparación (como Polh) que sintetizan el fragmento eliminado (Zhu, Niedernhofer et al. 2003). **B) Mecanismo esquematizado de la vía BER. Mecanismo principal, ruta de trazo corto.** I: Una amplia batería de glicosilasas reconocen la lesión y generan un sitio abásico (que también se puede generar espontáneamente por hidrólisis). II: La endonucleasa APE1 realiza una incisión en el sitio abásico. III: La polimerasa β rellena el hueco con el nucleótido adecuado tras la eliminación del sitio abásico y el complejo XRCC1-DNA ligasa III sella la lesión (Fortini, Pascucci et al. 2003). **Mecanismo minoritario, ruta de trazo largo:** PARP1 y PNK son importantes para la formación y protección de los extremos de la rotura. La endonucleasa FEN1 elimina la secuencia dañada, mientras Pol β, pol δ/ε y PCNA intervienen en la síntesis de la nueva hebra. La DNA ligasa I sella la lesión.

B) ROTURAS DE DOBLE HEBRA.

Las roturas de doble hebra pueden ser causadas por radiación ionizante (factor ambiental), radicales libres producto del metabolismo celular o nucleasas encargadas de realizar cortes programados en el DNA durante la recombinación meiótica o la recombinación de los segmentos génicos de las inmunoglobulinas (factores endógenos). La existencia de DSBs no reparadas en el genoma puede llevar finalmente a la aparición de aberraciones cromosómicas, las cuales, a su vez, pueden dar lugar a eventos de

transformación celular mediante translocaciones específicas o ciclos de amplificación génica (Difilippantonio, Petersen et al. 2002). Estos hechos están constatados por 4 líneas principales de evidencia:

- 1) La inestabilidad cromosómica inducida por radiación ionizante se ve enormemente incrementada en células con defectos en la reparación de DSBs (Matsumoto, Suzuki et al. 2000); Martin, Genesca et al. 2005).
- 2) La inducción de DSBs específicas mediante la endonucleasa SclI en células madre de ratón es suficiente para inducir un incremento significativo en recombinaciones intercromosómicas (Richardson and Jasin 2000).
- 3) Los puntos de rotura programada en la recombinación de los segmentos génicos de las inmunoglobulinas están involucrados en muchas de las translocaciones cromosómicas en tumores linfoides (Vanasse, Concannon et al. 1999; Difilippantonio and Nussenzweig 2007).
- 4) Tanto los pacientes humanos como los modelos murinos deficientes en factores de las vías de señalización de DSBs padecen una gran inestabilidad cromosómica (Ferguson, Sekiguchi et al. 2000; O'Driscoll and Jeggo 2006). El ejemplo más claro lo constituyen la predisposición al cáncer y la inestabilidad cromosómica características del síndrome de *ataxia telangiectasia*, causado por la deficiencia de la kinasa ATM, impulsor primario de los puntos de control de daño en el DNA en distintas fases del ciclo celular (*checkpoints*) inducidos por DSBs (Shiloh and Kastan 2001).

Mecanismos de reparación de roturas de doble hebra.

Las células eucarióticas reparan las DSBs mediante dos mecanismos principales: Recombinación Homóloga (HR) y Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ). La **Recombinación Homóloga** actúa principalmente cuando las dos cromátidas hermanas están alineadas: fase S tardía, G2 y M del ciclo celular. Además, es la principal vía de reparación de las roturas programadas que se generan durante la meiosis en las células germinales. La **Unión de Extremos No Homólogos** es la vía preferente para la reparación de las DSBs durante la mayor parte del ciclo celular (fases S temprana, G0 y G1) en células de mamífero (Takata, Sasaki et al. 1998). También se encarga de reparar las roturas programadas que se generan durante la recombinación de los segmentos génicos de las inmunoglobulinas (Bassing, Swat et al. 2002; Bertocci, De Smet et al. 2003). De hecho, los modelos murinos deficientes en factores de NHEJ tienen defectos en el desarrollo del sistema linfóide (Nussenzweig, Chen et al. 1996; Gu, Seidl et al. 1997; Frank, Sekiguchi et al. 1998; Gao, Sun et al. 1998).

NHEJ y HR son vías definidas en ocasiones como “propensa a errores” y “libre de errores” respectivamente, pero se trata de una sobresimplificación. HR se considera un mecanismo más preciso que NHEJ porque emplea secuencias homólogas de otra parte del genoma (cromátidas hermanas, cromosomas homólogos o secuencias repetitivas en el mismo cromosoma o en uno diferente) como molde para la reparación. Sin embargo, la homología de la secuencia escogida como molde no siempre es del 100% e, incluso cuando sí lo es, existen evidencias en levaduras de que se generan mutaciones puntuales alrededor de la DSB por errores en la polimerización (Strathern, Shafer et al. 1995). En el caso de NHEJ, pese a que puede reparar con una fidelidad del 100% cuando se enfrenta a una DSB “limpia” (con los grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo), se tienden a generar mutaciones cuando se trata de DSBs que no pueden ser unidas directamente. Ante tal tipo de roturas, el proceso de NHEJ incluye el alineamiento de 1-4 bases

complementarias (*microhomología*) para la ligación de los extremos (Roth and Wilson 1986), dando lugar a pequeñas deleciones y, algunas veces, inserciones de unas pocas bases (Zhang, Wu et al. 2001; Juarez, Ruiz et al. 2006).

Por qué la célula escoge un mecanismo u otro ante una rotura es una cuestión no totalmente elucidada. De lo que acabamos de comentar, se pueden deducir dos de esos factores: el momento del ciclo celular y el tipo de DSB generada. De hecho, se postula que las DSBs producidas por un colapso en la horquilla de replicación son principalmente (incluso puede que exclusivamente) reparadas por HR, mientras que el resto de las roturas de doble hebra, requieran o no modificaciones previas a la ligación, son mayoritariamente reparadas por NHEJ (Shrivastav, De Haro et al. 2008). Sin embargo, existen evidencias de una competición-equilibrio entre las dos vías de reparación, como el hecho de que NHEJ permanece activa durante las fases S y G2 del ciclo celular (Takata, Sasaki et al. 1998), que hay diversos factores involucrados en ambas vías de reparación (Haber 1998; Chen, Silver et al. 1999) o que en los *focos* sobre las DSBs se pueden encontrar simultáneamente proteínas de NHEJ y de HR (Kim, Krasieva et al. 2005).

1. Recombinación Homóloga.

Las proteínas **MRE11**, **RAD50** y **NBS1** (también llamada *nibrina*) forman un complejo con actividad exonucleasa (**MRN**); que procesa ambos extremos de la rotura mientras los mantiene unidos (Connelly and Leach 2002). Previa fosforilación por ATM, este complejo genera extremos 3', seguidamente protegidos por **RPA1**. A continuación, se unen **RAD51** y otros miembros de la misma familia (como **RAD51B**, **RAD51C**, **XRCC2** y **RAD52**), junto con **BRCA1** y **BRCA2**, para promover la invasión de la hebra igual y no dañada de la cromátida hermana (o de otra secuencia homóloga, según el caso). El reclutamiento de la helicasa **RAD54** abre el DNA para permitir dicha invasión. Esta hebra actúa como molde para que la actividad polimerasa (cuyo efector aún se desconoce) rellene el hueco de forma fiel. Como consecuencia, se generan los *intermedios de Holliday* (*Holliday Junctions*), que pueden migrar a lo largo del cromosoma antes de ser procesados por las resolvasas (tampoco claramente identificadas en eucariotas) (Karran 2000; Thompson and Schild 2001).

La deficiencia en la mayoría de los factores de la recombinación homóloga es letal en el embrión, como es el caso de Rad50, Rad 51, MRE11, BRCA 1 y BRCA 2 (Lim and Hasty 1996; Sharan, Morimatsu et al. 1997; Luo, Yao et al. 1999; Yamaguchi-Iwai, Sonoda et al. 1999; Scully and Livingston 2000; Deng and Brodie 2001). Sin embargo, las deficiencias de Rad52 y Rad54 son intermedias (van Gent, Hoeijmakers et al. 2001): los ratones son viables pero hipersensibles a radiación y a otros agentes que producen lesiones en la doble hebra. Los ratones deficientes en Brca 1 o Brca 2 desarrollan diferentes tipos de tumores (revisado en (Daniel 2002; Moynahan 2002; Jhanwar-Uniyal 2003)).

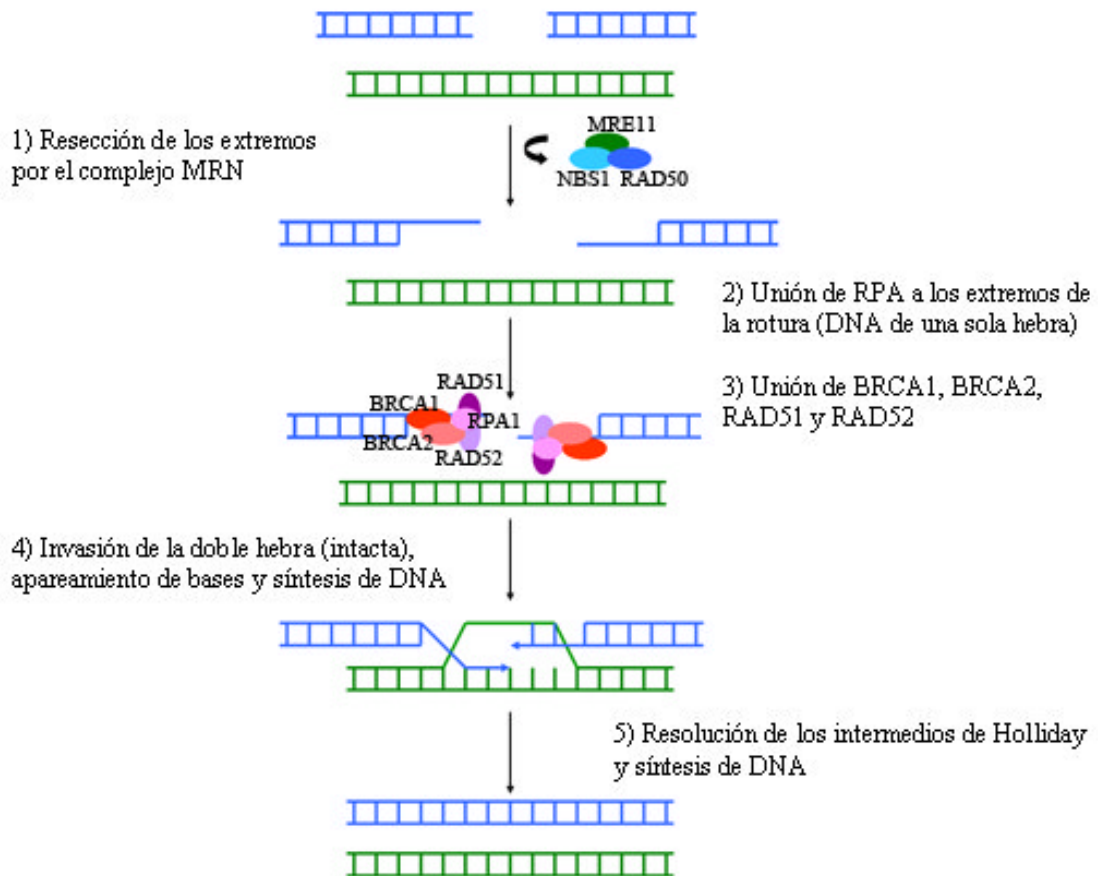


Figura I2. Mecanismo de reparación por HR.

2. Unión De Extremos No Homólogos.

El proceso de NHEJ comienza con la acción de **KU70** y **KU80** (subunidades del heterodímero KU), que reconoce la lesión y se une a sus extremos (Mimori and Hardin 1986; Anderson and Carter 1996). A dicha unión le sigue el reclutamiento, previa fosforilación por ATM, de la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de DNA (**DNA-PKcs**). La unión de esta última permite la fosforilación de todo el conjunto (complejo DNA-PK), lo que facilita la disociación entre complejo y DNA para que la **DNA ligasa IV** pueda sellar la lesión (Grawunder, Wilm et al. 1997; Lieber, Grawunder et al. 1997). Esta ligasa forma un complejo con **XRCC4** (Grawunder, Wilm et al. 1997), proteína que, junto con **Cernunos** (también llamado **XLF**) (Ahnesorg, Smith et al. 2006; Buck, Malivert et al. 2006; Tsai, Kim et al. 2007; Wu, Frit et al. 2007), promueve la actividad ligasa. El complejo puede ligar una cadena incluso cuando la otra está en una conformación que no lo permite directamente (Gu, Lu et al. 2007), con tal de que haya al menos 2 pares de bases de complementariedad terminal para estabilizar los extremos (Lieber, Ma et al. 2004). Este hecho nos da una mayor percepción de la enorme versatilidad de este sistema de reparación, que convierte en su sustrato a casi cualquier tipo de DSB. La delección o inactivación de cualquiera de estas proteínas (consideradas los **factores principales** de NHEJ) induce marcada sensibilidad a la radiación ionizante y a otros agentes que provocan DSBs, así como defectos en la recombinación V(D)J (Bassing and Alt 2004; Meek, Gupta et al. 2004; Meek, Dang et al. 2008). Los ratones deficientes en DNA-PKcs o ligIV/XRCC4 presentan inmunodeficiencia severa combinada (SCID, *Severe Combined Immunodeficiency*), pero el fenotipo de los deficientes en Ku es SCID-like, con una recombinación V(D)J no

completamente bloqueada y con un número muy bajo de linfocitos T (Dudley, Chaudhuri et al. 2005). XLF es una excepción, porque aunque su inactivación sí provoca una marcada sensibilidad a la radiación, los defectos en el desarrollo de linfocitos B son poco severos (Ahnesorg, Smith et al. 2006; Buck, Malivert et al. 2006). De hecho, se ha cuestionado que XLF pueda ser considerado un factor principal de NHEJ (Li, Alt et al. 2008), siendo mejor clasificado dentro del grupo de los **factores accesorios**, que son aquellos que sólo son necesarios en determinadas condiciones fisiológicas o tipos de DSBs específicos, como son las proteínas con actividad exonucleasa o polimerasa. La exonucleasa **Artemis** forma un complejo con DNA-PKcs (Ma, Pannicke et al. 2002; Mahajan, Nick McElhinny et al. 2002; Dahm 2007) y su deficiencia provoca un fenotipo “SCID-like” (Moshous, Callebaut et al. 2001), Similar al de la deficiencia en Ku. Hay 3 polimerasas descritas con actividad en NHEJ (se dedica un apartado específico a la actividad polimerasa en NHEJ más adelante): la nucleotidil-transferasa terminal (**TdT**) (Komori, Pricop et al. 1996) y las DNA polimerasas mu (**pol μ**) y lambda (**pol λ**), que son reclutadas al complejo a través de ku (Mahajan, Nick McElhinny et al. 2002; Fan and Wu 2004; Ma, Lu et al. 2004). Además, se ha propuesto recientemente el papel de otras proteínas accesorias como PNK (*Polynucleotide Kinase*), WRN (*Werner Syndrome Helicase*) y APLF (*Aprataxin and PNKP (Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase) Like Factor*) (revisado en (Mahaney, Meek et al. 2009)).

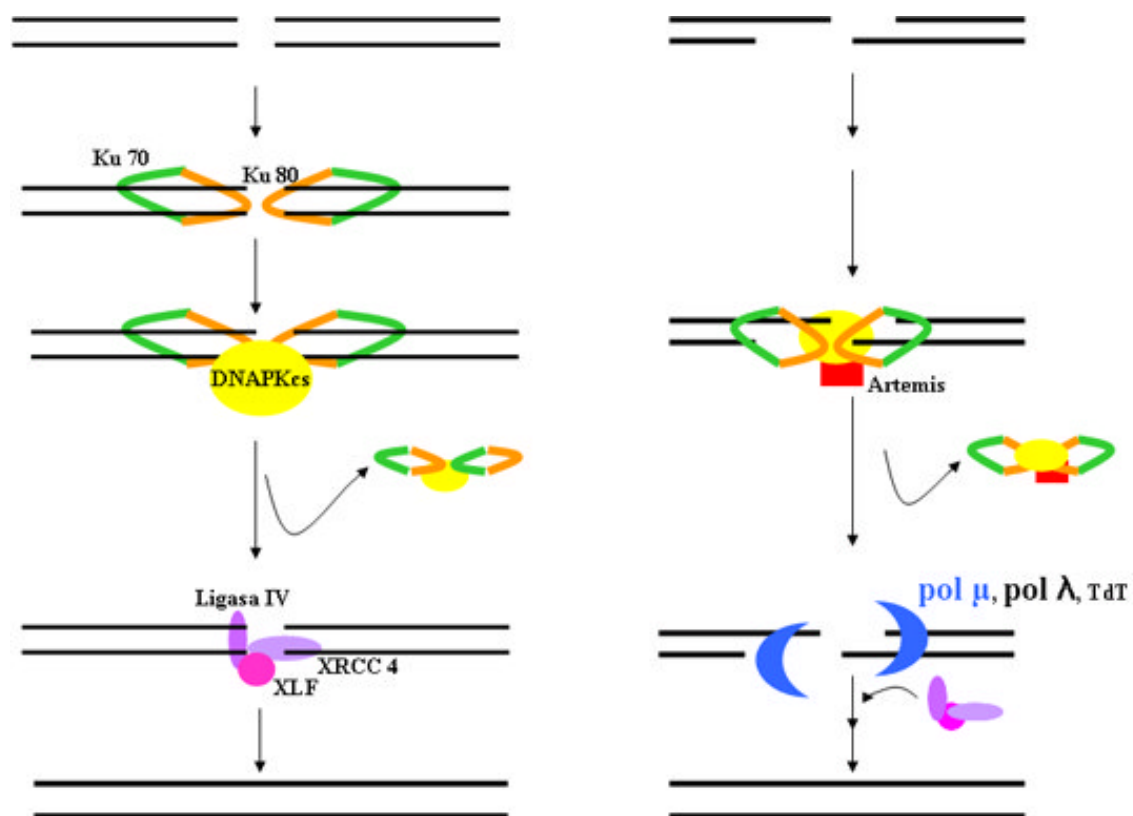


Figura 13. Mecanismo de NHEJ. A la izquierda, se representa la reparación de una rotura que sólo requiere unión directa de los extremos. A la derecha, la reparación de una rotura con extremos protuberantes, que requieren procesamiento previo a la ligación, por las proteínas accesorias.

El proceso descrito de *end joining* se cita muchas veces como C-NHEJ, por ser considerado la vía clásica. Esto se debe a que existen mecanismos alternativos, B-NHEJ, que actúan en ausencia de alguno de los factores principales de NHEJ (Nevaldine, Longo et al. 1997; DiBiase, Zeng et al. 2000; Guirouilh-Barbat, Huck et al. 2004; Guirouilh-Barbat, Huck et al. 2008). Los componentes de este sistema se desconocen aún, pero recientemente se ha identificado como miembro a la DNA ligasa III (Audebert, Salles et al. 2004; Wang, Rosidi et al. 2005). Este mecanismo no es sensible a mutaciones en los componentes de HR (DiBiase et al., 2000; Wang et al., 2001; Iliakis et al., 2004).

NHEJ en el desarrollo de los linfocitos.

Los linfocitos B y T se originan a partir de células precursoras que se encuentran en la médula ósea. Los receptores de los linfocitos, inmunoglobulinas (Ig) en el caso de los linfocitos B y TCR (*T Cell Receptor*) en el caso de los linfocitos T, están compuestos por una región variable (unida directamente a una región antigénica) y una región constante (C). Durante el desarrollo temprano de las células B y T, los exones que codifican la región variable son ensamblados a partir de los segmentos génicos germinales V (*Variable*), D (*Diversity*) y J (*Joining*) mediante el proceso denominado “recombinación V(D)J” (revisado en (Bassing, Chua et al. 2002; Bassing, Swat et al. 2002; Jung and Alt 2004). La recombinación VDJ de los linfocitos T se produce en el timo, donde son sometidos a distintos procesos de selección y expansión clonal antes de migrar a los órganos linfoides secundarios. En el caso de los linfocitos B, esta recombinación tiene lugar en la médula ósea, desde donde estas células migran a los órganos linfoides secundarios para determinar su función efectora (mediante *recombinación de cambio de clase*) y aumentar su especificidad antigénica (mediante *hipermutación somática*).

➤ Recombinación V(D)J.

Este proceso requiere la inducción de DSBs entre las secuencias codificantes y las señales de recombinación (RSS, *Recombination Signal Sequence*) que flanquean los segmentos génicos. Estas roturas en el DNA son realizadas por las proteínas RAG 1 (*Recombination Activating Gene 1*) y RAG 2 (*Recombination Activating Gene 2*) (Mombaerts, Iacomini et al. 1992; Shinkai, Rathbun et al. 1992; Lee and Desiderio 1999) y sucesivamente reparadas mediante la maquinaria de NHEJ para completar la recombinación V(D)J (revisado en (Bassing and Alt 2004)) (figura I4). La delección de cualquiera de las proteínas principales de NHEJ da como resultado una inmunodeficiencia severa combinada (SCID, *Severe Combined Immunodeficiency*) del ratón (aunque los *knockout* de LigIV y de Xrcc4 necesitan también la delección de p53 para ser viables (Frank, Sekiguchi et al. 1998; Gao, Chaudhuri et al. 1998; Gao, Ferguson et al. 2000)).

Las inmunoglobulinas de los linfocitos B están constituidas por cuatro cadenas, dos pesadas (IgH, *Immunoglobulin Heavy Chain*) y dos ligeras (IgL, *Immunoglobulin Light Chain*). Las cadenas IgH e IgL se reordenan durante el desarrollo de los linfocitos mediante la recombinación VDJ, pero sólo la IgH experimenta un segundo proceso de recombinación (recombinación de cambio de clase) para pasar de ser IgM a ser IgA, IgG o IgE, según la función efectora que esta cadena recombinada proporcione a la inmunoglobulina. El desarrollo de los linfocitos B comienza con el ensamblaje VDJ de

la cadena IgH en los linfocitos pro-B ($B220^+CD43^-IgM^-$) para dar lugar al estado pre-B ($B220^+CD43^-IgM^+$), los cuales pueden migrar a los órganos linfoides periféricos (revisado en (Willerford, Swat et al. 1996)).

El TCR está constituido por dos cadenas principales conectadas por puentes disulfuro. Las cadenas δ y γ forman el TCR de los linfocitos inmaduros $CD4^-CD8^-$ (*dobles negativos* (DN)) que llegan al timo. Allí se produce el ensamblaje de la cadena β , cuya expresión promueve la diferenciación y expansión de linfocitos $CD4^+CD8^+$ (*dobles positivos* (DP)), en los que se ensambla la cadena α para generar finalmente el TCR completo $\alpha\beta$. La expresión de ambas cadenas permite la diferenciación de $CD4^+$ o $CD8^+$ (*simples positivos* (SP)), los cuales, tras ser sometidos a procesos de selección, pueden migrar a los órganos linfoides periféricos (revisado en (Willerford, Swat et al. 1996)).

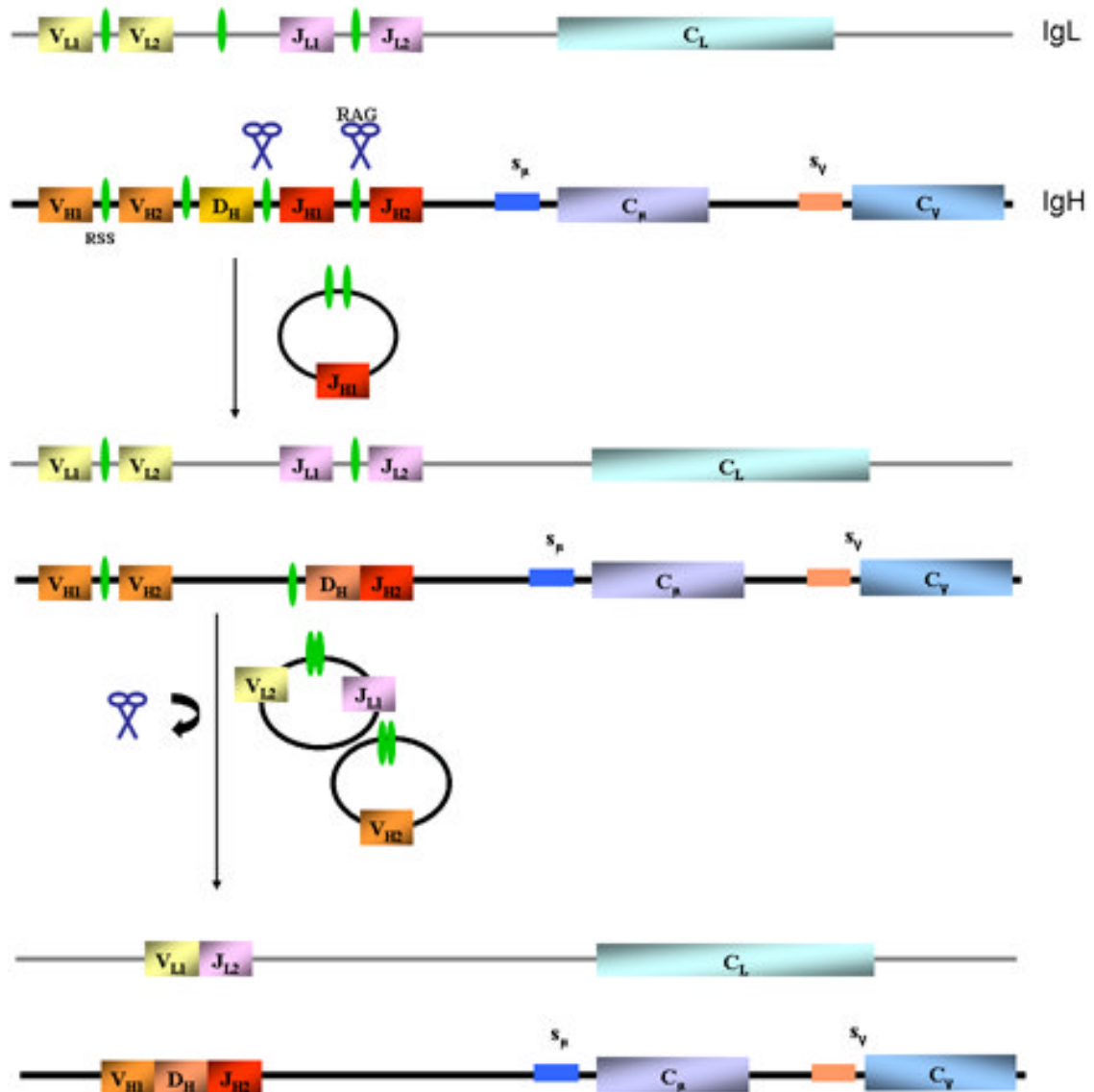


Figura I4. Representación simplificada del proceso de recombinación VDJ. Rag1 y RAG 2 producen un corte en una hebra del DNA que, por ataque nucleofílico del 3'-OH libre, se convierte en una DSB. El corte se produce en las secuencias señal (RSS), que se recombinan entre ellas siguiendo reglas específicas (Agrawal and Schatz 1997; Gellert 2002; Lieber, Ma et al. 2004). Los segmentos génicos entre ambas RSS son deletados (y forman una horquilla cerrada), mientras que los segmentos flanqueantes a las RSS por el exterior se comportan como 2 extremos de una DSB que será reparada mediante NHEJ (Grawunder, Zimmer et al. 1998; Grawunder, Zimmer et al. 1998; Ma, Pannicke et al. 2002; Lieber, Ma et al. 2004). En la cadena pesada, recombinan primero los segmentos D con los J y después se unen los V al segmento DJ ya recombinado. Sin embargo, en la cadena ligera, el proceso de recombinación es directamente VJ y en dicha etapa es donde interviene pol μ , probablemente con una función similar a la que TdT ejerce en la cadena pesada.

➤ **Hipermutación somática y Recombinación de Cambio de Clase.**

En los órganos linfoides periféricos, los linfocitos B maduros (que ya han recombinado sus segmentos VDJ) experimentan dos procesos: hipermutación somática y recombinación de cambio de clase.

1) El proceso de **hipermutación somática** (SHM, *Somatic Hypermutation*) es una expansión clonal “dirigida por antígeno” que tiene lugar en la región variable de la inmunoglobulina (revisado en (Neuberger 2008)). Dicho proceso es dependiente de AID (*Activation-Induced Deaminase*), que produce desaminaciones que finalmente resultan en mutaciones en la región variable. Aquellas mutaciones que derivan en una mayor especificidad antigénica son seleccionadas ((Wu, Feng et al. 2003; Besmer, Gourzi et al. 2004; Li, Woo et al. 2004)). Se postula que la DNA polimerasa μ está implicada en la introducción de mutaciones de este proceso (Chiu, Pan et al. 2002; Ruiz, Lucas et al. 2004; Lucas, Lain de Lera et al. 2005), pero no es necesaria para una eficiente SHM (Bertocci, De Smet et al. 2003; Lucas, Lain de Lera et al. 2005).

2) La **recombinación de cambio de clase** (CSR, *Class Switch Recombination*) constituye el segundo proceso de recombinación de las inmunoglobulinas, pero, esta vez, en la cadena pesada (locus IgH) de la región constante. Durante la CSR, las células B maduras unen su exon VDJ_H (ya ensamblado) a una de las series de genes C (de la región constante) para modificar la función efectora del anticuerpo (Stavnezer 1996; Stavnezer, Guikema et al. 2008). Este proceso se inicia mediante roturas programadas en el DNA. La proteína encargada es AID, que produce desaminaciones que resultan en DSBs (mecanismo no completamente elucidado actualmente) en largas regiones repetitivas (regiones S, *switch*) que se encuentran aguas abajo (*downstream*) de los genes C_H. Estas DSBs se suceden de un proceso de recombinación/delección entre dos regiones S (revisado en (Manis, Tian et al. 2002; Chaudhuri and Alt 2004)). El mecanismo simplificado se muestra en la siguiente figura (I5, imagen adaptada de (Bassing and Alt 2004)).

CSR es deficiente en linfocitos Ku70^{-/-} y Ku80^{-/-} (Casellas, Nussenzweig et al. 1998; Manis, Gu et al. 1998; Guirouilh-Barbat, Rass et al. 2007). Hay una controversia acerca del papel de DNA-PKcs en este contexto, en función del modelo y de la técnica empleada, pero apuntan mayoritariamente hacia el requerimiento de esta proteína sólo en algunas roturas y a que la función catalítica de DNA-PKcs puede no mediar este proceso (revisado en (Kotnis, Du et al. 2009)). El cambio de clase a IgG o IgE se reduce de un 20 a un 50% en células deficientes en Xrcc4 (Soulas-Sprauel, Le Guyader et al. 2007; Yan, Boboila et al. 2007).

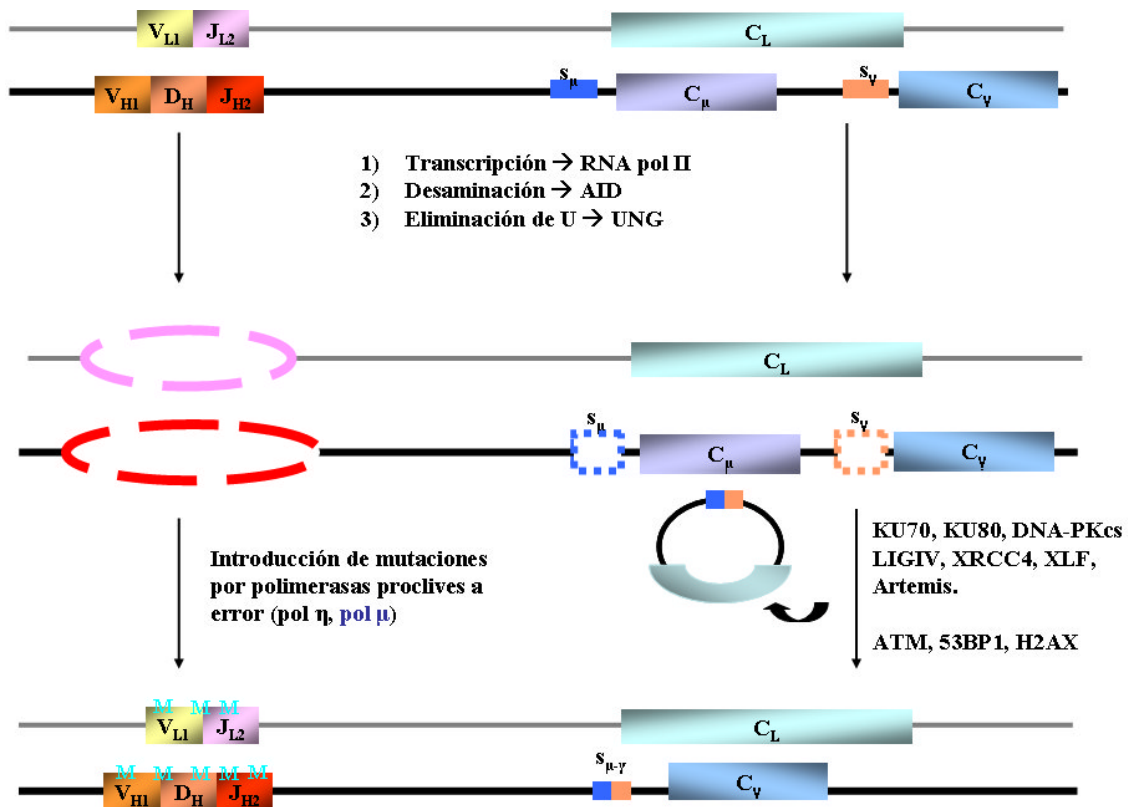


Figura I5. Representación simplificada de SHM y CSR. Los procesos de SHM (región variable) y CSR (región constante de la cadena pesada) dependen del proceso de transcripción. AID produce desaminaciones en las citosinas de la cadena no transcrita, y los uracilos formados son eliminados por UNG, formando así sitios abásicos. En SHM, los sitios abásicos son rellenos por polimerasa proclives a error (como pol η y, probablemente, pol μ). Durante CSR, los exones expresados inicialmente por la región constante (C_μ) de la cadena pesada son reemplazados por otros segmentos génicos (C_γ , C_α , C_ϵ) situados en posición 3', lo cual implica un cambio en el isotipo de la inmunoglobulina (de IgM, a IgG, IgA o IgE) (Manis, Tian et al. 2002). Para ello, AID y UNG actúan sobre las regiones S, donde APE1 elimina los sitios abásicos, lo que finalmente genera DSBs. Las dos regiones S se unen de forma similar a los segmento V(D)J, mediante NHEJ. El proceso es dependiente de ATM (Lumsden, McCarty et al. 2004; Reina-San-Martin, Chen et al. 2004), 53BP1 (Bothmer, Robbiani et al. 2010; Manis, Morales et al. 2004; Reina-San-Martin, Chen et al. 2007) y H2AX (Reina-San-Martin, Difilippantonio et al. 2003; Franco, Gostissa et al. 2006), entre otros. CSR puede tener lugar en ausencia de cualquiera de los factores principales de NHEJ, aunque de forma

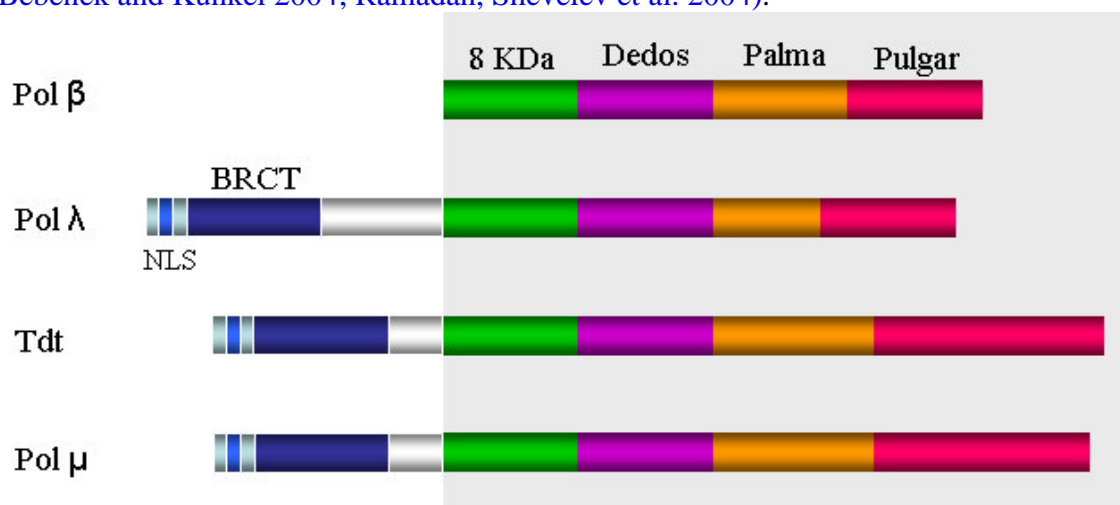
Actividad polimerasa en NHEJ.

La actividad polimerasa es imprescindible para rellenar los huecos (*gaps*) generados por el alineamiento de las cadenas (Wilson and Lieber 1999).

Las tres polimerasas implicadas en NHEJ (pol μ , pol λ , TdT) están íntimamente relacionadas en cuanto a estructura, dependencia de molde y actividad, pero no se ha demostrado (aunque es posible) redundancia en sus funciones.

1) Su similar estructura las incluye en la **familia X de las polimerasas**, grupo constituido por proteínas encargadas de rellenar huecos de unos pocos nucleótidos durante la reparación del DNA y que tienden a cometer errores (*error-prone*) durante la polimerización. Hay 4 polimerasas en eucariotas superiores que pertenecen a este grupo: pol μ , pol λ , TdT y pol β (revisado en (Yamitch and Sweasy)). Todas ellas comparten una estructura básica en torno a un dominio catalítico altamente conservado (fig. I6,

adaptada de la Tesis Doctoral de P. Andrade, 2009) (Ruiz, Dominguez et al. 2001; Bebenek and Kunkel 2004; Ramadan, Shevelev et al. 2004).



(Tesis Doctoral de P. Andrade, 2009)

Figura I6. Representación esquemática de los dominios estructurales de la familia X de las polimerasas en mamíferos. NLS (*Nuclear Location Sequence*): Secuencia de localización nuclear. Dominio BRCT: *Breast Cancer C-Terminal*.

- A diferencia de pol β, las polimerasas pol λ, pol μ, y TdT tienen un dominio BRCT (*Breast Cancer C-Terminal*) amino terminal, que permite la interacción con otras proteínas, estando asociado con el procesamiento de los extremos de DNA durante NHEJ ((Zhang, Morera et al. 1998; Mahajan, Nick McElhinny et al. 2002; Fan and Wu 2004; Lee, Blanco et al. 2004; Nick McElhinny, Havener et al. 2005); revisado en (Mueller, Moon et al. 2008)).
- El dominio de 8 KDa se encarga de unir el 5'-fosfato del cebador (*primer*) aguas abajo (*downstream*) de la rotura. Pol β y pol λ tienen actividad DNA polimerasa y 5'-deoxirribosa 5'-fosfato liasa (intrínseca al dominio de 8KDa) (Matsumoto and Kim 1995; Garcia-Diaz, Bebenek et al. 2001), actividades necesarias para la reparación por escisión de bases (BER, del inglés, *Base Excision Repair*) (revisado en (Barnes and Lindahl 2004)).

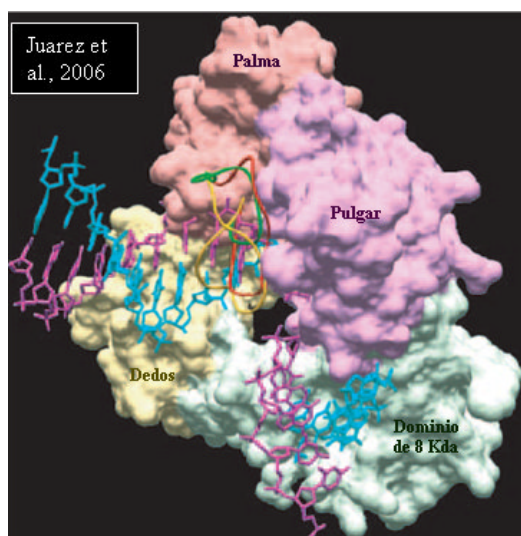
2) La actividad de TdT está restringida a la recombinación V(D)J en los linfocitos, mientras que pol μ y pol λ participan también en roturas no programadas. TdT es una polimerasa independiente de molde (Bollum, Chang et al. 1974), que contribuye a la heterogeneidad inmunológica generando fragmentos de secuencias aleatorias debido a la introducción de nucleótidos al azar (adiciones N) en las uniones entre los segmentos génicos de las inmunoglobulinas durante la recombinación V(D)J (Gilfillan, Benoist et al. 1995; Komori, Pricop et al. 1996). Pol λ interviene en la recombinación del *locus* de la cadena pesada, en un paso previo a la adición N (Bertocci, De Smet et al. 2006). Pol μ participa en la recombinación de extremos V y J en el *locus* de la cadena ligera κ tras la síntesis de las regiones N (Bertocci, De Smet et al. 2003). Aunque el porqué de la disociación de sus actividades no se conoce bien aún, existen evidencias que apuntan como principales responsables a la preferencia por el sustrato y a la dependencia de molde (mayor en pol λ que en pol μ, e inexistente en TdT) inherentes a cada enzima (Nick McElhinny, Havener et al. 2005).

La DNA polimerasa mu (pol μ).

La DNA polimerasa mu (pol μ) se identificó y caracterizó por primera vez en el año 2000, en el laboratorio del Dr. Luis Blanco. Se llegó a su identificación mediante búsqueda en las bases de datos RNA mensajeros expresados (*Expressed Sequence Tag*: EST) que cumplieren el patrón peptídico la familia X de las polimerasas, caracterizada por su participación en reparación de forma tendente a error (*error-prone polymerases*). Para ello, emplearon como sonda la secuencia de la DNA polimerasa X codificada por el virus de la peste porfina africana (Dominguez, Ruiz et al. 2000).

Pol μ se expresa en la mayoría de los tejidos, pero los mayores niveles se detectan en los tejidos linfoides, especialmente en la médula ósea, el timo y los centros germinales, donde tiene lugar el proceso de hipermutación somática (Brenner and Milstein 1966; Aoufouchi, Flatter et al. 2000; Dominguez, Ruiz et al. 2000; Lucas, Lain de Lera et al. 2005).


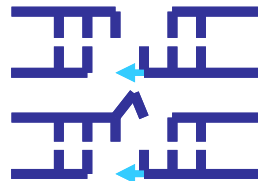


La pol μ humana está constituida por 494 aminoácidos y tiene un peso molecular de 52 KDa. El extremo amino-terminal contiene una secuencia de localización nuclear (LPKRRRAR) seguida de un dominio BRCT, recientemente cristalizado (DeRose, Clarkson et al. 2007), mediante el cual interacciona con KU y LIG IV ((Mahajan, Nick McElhinny et al. 2002); revisado en (Mueller, Moon et al. 2008)). Al BRCT le sigue el dominio de 8 KDa. El resto de la molécula es el dominio catalítico, que engloba los subdominios típicos de las polimerasas: *dedos*, *palma* y *pulgar* (Bebenek and Kunkel 2004; Moon, Garcia-Diaz et al. 2007).



1.7. Estructura de pol μ modelada sobre el cristal de TdT. El color magenta representa la hebra molde. Las diferentes conformaciones del loop I (predecibles) aparecen en rojo, amarillo y verde. Los subdominios de la DNA polimerasa μ se resaltan en verde (8 KDa), amarillo (dedos), rosa (palma) y magenta (pulgar).

Pol μ posee una fuerte homología con TdT (Aoufouchi, Flatter et al. 2000; Dominguez, Ruiz et al. 2000), pero difiere de los otros miembros de la familia en varios aspectos, descubiertos en su mayoría tras la reciente cristalización del dominio catalítico de esta polimerasa (Moon, Garcia-Diaz et al. 2007b). Entre los rasgos diferenciales en la

familia X de las polimerasas, destaca el **loop I** (Delarue, Boule et al. 2002; Garcia-Diaz, Bebenek et al. 2004; Nick McElhinny, Havener et al. 2005; Moon, Garcia-Diaz et al. 2007), bucle relacionado con la dependencia de molde (Delarue, Boule et al. 2002; Garcia-Diaz, Bebenek et al. 2004; Nick McElhinny, Havener et al. 2005; Juarez, Ruiz et al. 2006). Pol μ y TdT son enzimas parcial y totalmente independientes de molde, respectivamente, aunque la actividad principal de pol μ sí depende de molde (Dominguez, Ruiz et al. 2000; Ruiz, Dominguez et al. 2001). Esto se debe a la flexibilidad del **loop I**, que les confiere a pol μ y a TdT actividad transferasa terminal (de la que carecen pol λ y pol β , dependientes de molde). El **loop I** de pol μ , que ha resultado estar desordenado en el cristal (Moon, Garcia-Diaz et al. 2007b), puede adoptar diferentes conformaciones dependiendo de la naturaleza del sustrato (Nick McElhinny, Havener et al. 2005; Juarez, Ruiz et al. 2006), lo que explica que pol μ pueda ser tanto dependiente como independiente de molde: a diferencia del de TdT, el **loop I** de pol μ es móvil y se aparta cuando hay una cadena molde. Además, existe un residuo específico de histidina en pol μ (His³²⁹) y TdT (His³⁴²) (que es una glicina en las otras dos polimerasas), que contribuye al correcto posicionamiento del cebador cuando no hay un molde, favoreciendo la actividad transferasa terminal (Moon, Garcia-Diaz et al. 2007). El hecho de que la actividad transferasa terminal sea limitada en pol μ y no en TdT parece ser debido a un residuo específico de arginina (Arg³⁸⁷ en pol μ y Lys⁴⁰³ en TdT) (Andrade, Martin et al. 2009).

Estructura de la DSB	Características de la DSB	Actividades/características de las polimerasas	Pol
	1) Molde discontinuo. 2) Molde complementario en un extremo de la rotura (una base desapareada en el otro extremo). 3) Síntesis dirigida por molde.	<ul style="list-style-type: none"> • DNA polimerasa poco procesiva. • 5'-3'-DNA polimerasa. • Pol λ y pol μ puede utilizar eficientemente moldes con una base desapareada, mientras que pol β es incapaz. • BRCT adecuado para unirse a factores de NHEJ. 	λ μ
	1) Molde discontinuo. 2) Molde no complementario en los extremos de la rotura (en b , un 2º nucleótido no complementario en uno de los extremos). 3) Síntesis dirigida por pseudo-molde (b).	<ul style="list-style-type: none"> • DNA polimerasa poco procesiva. • 5'-3'-DNA polimerasa. • Dislocación del molde (b). • BRCT adecuado para unirse a factores de NHEJ. 	μ
a)  b) 	1) Molde discontinuo. 2) Molde no complementario a los extremos de la rotura. Sólo un extremo 3'-protuberante. 3) Síntesis no dirigida por molde.	<ul style="list-style-type: none"> • DNA polimerasa poco procesiva. • 5'-3'-DNA polimerasa • Transferasa terminal ilimitada (TdT) o limitada (μ). • BRCT adecuado para unirse a factores de NHEJ. 	TdT μ

La DNA polimerasa μ actúa con poca fidelidad (Aoufouchi, Flatter et al. 2000; Dominguez, Ruiz et al. 2000; Reynaud, Frey et al. 2001; Ruiz, Dominguez et al. 2001) debido a su capacidad para dislocar la doble hebra en una o más pares de bases, utilizando así nucleótidos alejados del extremo de la DSB (Zhang, Wu et al. 2001), lo cual concuerda con la búsqueda de microhomología característica de NHEJ. Además, pol μ puede introducir indiscriminadamente deoxirribonucleótidos o ribonucleótidos (Ruiz, Juarez et al. 2003), lo que potencia la capacidad de pol μ de generar mutaciones. Pol λ y pol μ puede utilizar eficientemente moldes con una base desapareada, mientras que pol β es incapaz (Nick McElhinny, Havener et al. 2005). Se ha sugerido que esta actividad está relacionada con el papel de pol λ y pol μ en NHEJ. Puede que, en comparación con pol β , las otras dos polimerasas presenten menos interacciones con el molde cerca del sitio activo (García-Díaz et al., 2004); de la misma forma que pol μ muestra muchas menos interacciones con nucleótidos en determinadas posiciones que pol λ .

II. Mecanismos celulares de prevención y respuesta a daño. P53 y su respuesta central ante roturas de doble hebra.

Los organismos han desarrollado mecanismos para mantener la integridad genómica induciendo parada del ciclo celular en respuesta a daño en el DNA. Esto permite disponer de un tiempo extra para que mecanismos de reparación especiales reparen dichas lesiones antes de que se incorporen a las horquillas de replicación en fase S. Para ello, la célula posee puntos de control o *checkpoints*, que se activan en respuesta a un nivel o cualidad de daño genómico. Sin embargo, si el daño remanente es demasiado, estos mismos mecanismos harán que la célula entre en senescencia o apoptosis, mecanismos de gran importancia para evitar la transformación celular (Campisi 2005; Finkel, Serrano et al. 2007). P53 es un factor de transcripción involucrado en diferentes funciones celulares, como control de ciclo celular, apoptosis y diferenciación (Levine 1997; Bates, Hickman et al. 1999; Bates and Vousden 1999; Oren and Rotter 1999). La gran mayoría de la actividad de P53 proviene de su habilidad para inducir la transcripción de diferentes genes (Selivanova and Wiman 1995), pero P53 también ejerce su acción mediante interacciones proteína-proteína (Ko and Prives 1996; Hainaut and Hollstein 2000). Adicionalmente, se ha descrito que P53 posee actividad exonucleasa 3'-5', citoplasmática y nuclear, cuya función no ha sido completamente elucidada (Janus, Albrechtsen et al. 1999; Lin, Chen et al. 2000; Skalski, Lin et al. 2000; Bakhanashvili 2001; Bakhanashvili 2001; Shaked, Yavnilovitch et al. 2002; Lilling, Elena et al. 2003; Bakhanashvili, Novitsky et al. 2004; Harrigan, Fan et al. 2007; Bakhanashvili, Gedelovich et al. 2008; Ahn, Poyurovsky et al. 2009; Grinberg, Teiblum et al. 2010).

Cuando la célula no está sometida a estrés, la proteína P53 se encuentra en estado latente y en niveles bajos. Diferentes tipos de estrés genotóxico disparan cascadas de

señalización que tienen como resultado la estabilización transitoria de P53, lo que hace que se acumule en el núcleo y que pase a un estado transcripcionalmente activo (Appella and Anderson 2001). Las DSBs son las lesiones más importantes en la activación de P53 (Nelson and Kastan 1994). Los niveles de P53 condicionan la respuesta celular: un ligero aumento en los niveles de esta proteína llevan a la célula a detener su ciclo para poder ser reparada, pero grandes incrementos hacen a la célula entrar en apoptosis (Chen, Ko et al. 1996). Esta función de p53 hace de él uno de los genes supresores de tumores más importantes en mamíferos. De hecho, más del 50% de los tumores humanos tienen mutaciones en componentes de la vía de P53 (Hollstein, Sidransky et al. 1991).

Regulación de p53:

Las kinasas ATM y ATR disparan diversas respuestas ante daño o un colapso en la replicación del DNA durante la activación de los *checkpoints* G1-S, intra-S o G2 (revisado en (Shiloh 2003; Shiloh 2003)), las cuales convergen, finalmente, en la inducción de P53:

- El evento principal en G1/S es la activación de P53, que induce la transcripción de p21, un inhibidor de la maquinaria del ciclo celular (Shiloh and Kastan 2001). Las señales que regulan P53 convergen finalmente en la disrupción de la interacción entre P53 y su regulador negativo MDM2. ATM interrumpe dicha interacción mediante la fosforilación de P53 y de MDM2, promoviendo también la activación de P53 mediante la fosforilación de Chk2 (Ahn, Li et al. 2002; Xu, Tsvetkov et al. 2002), esencial para que P53 se active *in vivo* (Hirao, Cheung et al. 2002; Takai, Naka et al. 2002).
- Las 2 vías conocidas en intra-S son ATM-Chk2-CDC25A y ATM-NBS1-SMC1 (Falck, Petrini et al. 2002).
- El evento central en G2 es la inhibición de CDC25C, fosfatasa promotora de mitosis. La vía TM/ATR-CHK1 es la responsable de la activación de G2 en respuesta a daño inducido por irradiación (Brown and Baltimore 2003).

P53 también puede inducirse en repuesta a daño en el DNA por proteínas específicas de reparación, tales como BRCA1 (Ouchi, Monteiro et al. 1998), ATR (*ATM -Related*) (Brown and Baltimore 2000) y DNA-PKcs (Shieh, Ikeda et al. 1997).

Aunque son muchas las señales de estrés que activan la vía de P53, las que mejor se conocen son las desencadenadas por daño en el DNA o por un crecimiento celular descontrolado inducido por oncogenes (también denominado *estrés oncogénico*). Las proteínas clave en dicha activación son las kinasas **ATM** y **CHK2** y el supresor de tumores **P19^{ARF}** (P14^{ARF} en humanos), que actúa indirectamente, reclutando Mdm2 al nucleolo (potenciando así la estabilización de P53)(Dias, Milne et al. 2006).

El principal inhibidor de P53 es **MDM2**, que hace uso de su actividad E3-ubiquitin-ligasa para reclutar a P53 al proteosoma (Honda, Tanaka et al. 1997), donde es degradado. Pero, además, es una diana directa de éste (Barak, Juven et al. 1993; Lahav, Rosenfeld et al. 2004), de manera que se produce un circuito de autorregulación de p53.

Senescencia mediada por p53:

P53 induce senescencia mediante la activación transcripcional de p21 (el cual también puede ser activado por otras vías), que es un inhibidor de CDKs. P21 inhibe la progresión del ciclo celular, principalmente, mediante la inhibición de CDK2, cuya actividad es necesaria para la puesta en marcha de los orígenes de replicación, la

actividad de proteínas involucradas directamente en la síntesis de DNA y la fosforilación de Rb (Zhu, Abbas et al. 2005). Dicha fosforilación disocia a Rb de E2F, el cual, una vez liberado, activa transcripcionalmente a efectores requeridos para la progresión del ciclo celular (Narita, Nunez et al. 2003). Otro inhibidor de CDKs que induce senescencia a través de Rb es p16^{INK4a} (inhibidor del complejo ciclina D/Cdk4 y 6) (Serrano, Gomez-Lahoz et al. 1995; Serrano, Lee et al. 1996; Lowe and Sherr 2003), el cual no es directamente activado por P53. Sin embargo, la vía P16^{INK4a}-Rb no se expresa en todos los tipos celulares en el ratón (Ben-Porath and Weinberg 2005).

Apoptosis mediada por p53:

El estrés genotóxico puede conducir a apoptosis mediada por P53, lo cual se lleva a cabo mediante diferentes dianas de esta proteína. **BAX**, **PUMA** y **NOXA** pertenecen al grupo pro-apoptótico de la familia Bcl-2. Puma y Noxa promueven la muerte celular de manera dependiente de P53 (Jeffers, Parganas et al. 2003; Villunger, Michalak et al. 2003), aunque Puma también se activa por señales independientes de éste (Jeffers, Parganas et al. 2003). Bax, también diana directa de P53 (Chipuk and Green 2004; Chipuk, Kuwana et al. 2004), provoca la liberación del citocromo c mediante la formación de poros en la membrana mitocondrial (Miyashita, Krajewski et al. 1994; Miyashita and Reed 1995). Este “escape” promueve la activación del *apoptosoma*, complejo del que también forman parte la **pro-CASPASA 9** y **APAF-1**, otra diana directa de P53 (Soengas, Alarcon et al. 1999; Schuler, Bossy-Wetzel et al. 2000).

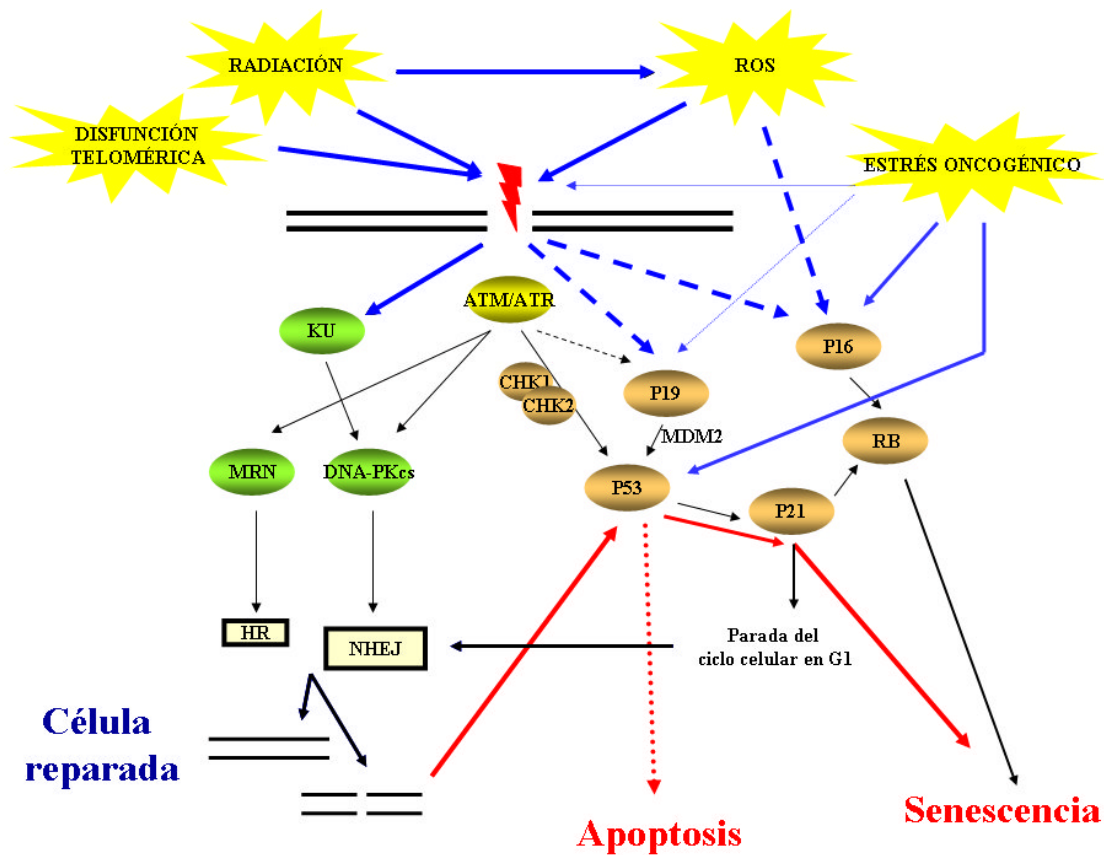


Figura I8. Representación simplificada de la respuesta celular ante daño en el DNA. La disfunción telomérica o agentes genotóxicos como la radiación ionizante o los ROS producen DSBs (la radiación lo hace directamente y a través de la generación de ROS). Estas lesiones son detectadas por ATM/ATR, sensor de daño que activa las vías de control de ciclo celular (1) y las de reparación del DNA (2). **1)** Las vías de ATM/ATR y CHK1/CHK2 cooperan en la estabilización de P53. P19 también estabiliza a P53, para lo que secuestra a MDM2 (principal inhibidor de P53). P53 induce la expresión de p21, lo que tiene como consecuencia el arresto celular en G1. Si la célula no es suficientemente reparada, el daño remanente promoverá la activación de los procesos de apoptosis o senescencia a través de P53. La elección de una u otra vía depende de los niveles de P53, que variarán en función de la magnitud del daño. El estado de senescencia es inducido, además, por P16, a través de la activación de Rb (también promovida por P21). El estrés causado por la sobreexpresión de oncogenes induce la expresión de p16 y p53 (promoviendo la entrada de la célula en senescencia) (revisado en (Ohtani, Mann et al. 2009)), y puede que también provoque DSBs (Dickey, Baird et al. 2009) y la inducción de p19 (Serrano, Lee et al. 1996; Bates, Phillips et al. 1998; Zindy, Eischen et al. 1998; Tolbert, Lu et al. 2002). **2)** ATM/ATR activan los mecanismos de reparación mediante la inducción del complejo MRX y de DNA-PKcs (entre otros). KU, iniciador de NHEJ, reconoce la lesión y recluta a DNA-PKcs (fosforilada por ATM/ATR). MRX, iniciador del mecanismo de HR, compete con KU por unirse a los extremos de los DSBs. La vía mayoritaria en G1 es NHEJ.

III. Envejecimiento como consecuencia de daño en el DNA.

El tiempo de vida de un organismo es un parámetro modificable. El ejemplo clásico es la restricción calórica en la dieta (Kennedy, Steffen et al. 2007; Anderson, Shanmuganayagam et al. 2009), de la que se ha demostrado que amplía el tiempo de vida en un número creciente de organismos, tanto invertebrados como vertebrados (Chapman and Partridge 1996; Lakowski and Hekimi 1998; Jiang, Jaruga et al. 2000; Lin, Defossez et al. 2000; Good and Tatar 2001; Fabrizio, Battistella et al. 2004; Colman, Anderson et al. 2009). La restricción calórica, además, retrasa la aparición de enfermedades asociadas al envejecimiento (Hursting, Smith et al. ; Gerstbrein, Stamatas et al. 2005; Fontana 2008; Steinkraus, Smith et al. 2008; Colman, Anderson et al. 2009; Joseph, Cole et al. 2009).

En humanos, la edad avanzada es considerada un factor de máximo riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y síndromes cardiovasculares, metabólicos y neoplásicos. Por tanto, el hallazgo de dianas que contribuyan al envejecimiento podría permitir que logremos retrasar/controlar la aparición de causas de morbilidad en la vejez.

Existen cuatro principales teorías que tratan de explicar el envejecimiento a nivel molecular. La teoría del **daño oxidativo** defiende que el envejecimiento es consecuencia del daño que los radicales libres celulares ejercen sobre proteínas, lípidos y DNA (Lapointe and Hekimi ; Valko, Leibfritz et al. 2007). Pero los resultados son equívocos, pues hay estudios en los que se muestran un aumento (Landis and Tower 2005; Schriner, Linford et al. 2005) y otros un descenso (Van Raamsdonk and Hekimi 2009) de la actividad de los sistemas de defensa ante el daño oxidativo con la edad. Otro grupo de teorías es el que atribuye el envejecimiento a la acumulación de **daño celular**, lo que no es excluyente con la del daño oxidativo. Células aisladas de individuos viejos acumulan daños en el DNA nuclear, proteínas mal plegadas y frecuencias incrementadas de deleciones en el DNA mitocondrial (asociadas con una capacidad respiratoria reducida). Se ha especulado que estos eventos dirigen aspectos generales y/o específicos del envejecimiento. La inflamación crónica, autoinmune o no, puede ser otro factor que, de la mano con el daño oxidativo, contribuya a la precipitación de las enfermedades asociadas con el envejecimiento (De la Fuente and Miquel 2009). El tercer grupo de teorías es el de la **proteotoxicidad** (Morimoto and Cuervo 2009), que atribuye el envejecimiento a la expresión de determinadas proteínas directa o indirectamente relacionadas con neurodegeneración y proclives a agregación (como, por ejemplo, trombina (Yin, Wright et al.), parkin (Oyama, Yoshimi et al.) y sinucleína revisado en (Hindle)). El **acortamiento telomérico** (Olovnikov 1973; Harley, Futcher et al. 1990; Ohki, Tsurimoto et al. 2001) constituye el cuarto factor que contribuye al envejecimiento celular (Blasco 2007). Este fenómeno es característico de las células somáticas, en las que los niveles de actividad telomerasa son bajos (a diferencia de lo que ocurre en la línea germinal o en las células tumorales) (Blasco, Funk et al. 1995; Greenberg, Allsopp et al. 1998; Collins 2000).

En la investigación de los eventos moleculares participantes en el envejecimiento, los estudios genéticos han estado a la cabeza. Se han encontrado varias vías de señalización

cuya deficiencia se asocia a un mayor tiempo de vida. Se pueden destacar dos vías que están interconectadas y conservadas en invertebrados y mamíferos: la IIS (del inglés, *Insulin or Insulin-like growth factor 1 (IGF1) Signalling*) y la de TOR (del inglés, *Target of Rapamycin*). Por otro lado, estudios tanto en humanos como en modelos murinos han mostrado síndromes de progeria debida a defectos en el sistema de reparación de DNA o en el mantenimiento telomérico (Martin and Oshima 2000; Hoeijmakers 2001; Martin 2005), lo que implica daño en el DNA. Existen numerosas evidencias de que la respuesta celular al daño en el DNA juega un importante papel en la regulación del envejecimiento en organismos multicelulares (Hasty and Vijg 2002; Collado, Blasco et al. 2007).

DAÑO EN EL DNA, SENESCENCIA Y ENVEJECIMIENTO.

Pese al número de teorías diferentes sobre el envejecimiento, es un hecho constatado que el daño en el DNA contribuye al envejecimiento, y lo hace, principalmente, generando inestabilidad cromosómica y llevando a la célula a un estado senescente (Serrano and Blasco 2001; Sharpless and DePinho 2004). La senescencia es un estado celular caracterizado por: 1) parada del ciclo irreversible, 2) resistencia a estímulos de proliferación celular y 3) morfología y patrón genético alterados pero preservando la actividad metabólica (Hayflick 1965; Ben-Porath and Weinberg 2005; Campisi and d'Adda di Fagagna 2007; Finkel, Serrano et al. 2007). Existen varios mecanismos que inducen la senescencia, pero todos ellos convergen en p53 y Rb (revisado en (Ben-Porath and Weinberg 2005)).

La hipótesis de que el DNA es una importante diana de los cambios asociados al envejecimiento se encuentra respaldada por una serie de evidencias:

- 1) Las mutaciones y el daño en el genoma se acumulan con la edad (Dempsey, Odagiri et al. 1993; Jones, Thomas et al. 1995; Morley 1995). Los agentes genotóxicos son muy numerosos, y su efecto podría verse potenciado por una maquinaria de reparación envejecida (puesto que la eficiencia de los sistemas de reparación disminuye con la edad (Doria, Barattini et al. 2004)).
- 2) Las lesiones no reparadas en el DNA conducen frecuentemente a aberraciones cromosómicas (Ferguson, Sekiguchi et al. 2000; O'Driscoll and Jeggo 2006), cuya incidencia es elevada en células senescentes. Además, las células a las que se les ha delecionado alguna de las proteínas involucradas en el metabolismo cromosómico muestran senescencia prematura en cultivo (Vogel, Lim et al. 1999; Espejel, Klatt et al. 2004; Espejel, Martin et al. 2004). Por tanto, parece haber una clara conexión entre reparación del DNA y senescencia, lo que a su vez contribuye al envejecimiento del organismo. La evidencia de que la senescencia celular juega un papel en el envejecimiento es correlativa: las células senescentes se acumulan en el organismo con la edad y en zonas con patologías (Itahana, Campisi et al. 2004) y muchos modelos murinos y síndromes humanos de envejecimiento prematuro muestran senescencia celular prematura *in vitro* ((Celeste, Petersen et al. 2002; de Boer, Andressoo et al. 2002), revisado en (Hasty, Campisi et al. 2003)).
- 3) La mayoría de los síndromes de envejecimiento prematuro son consecuencia de mutaciones en genes que codifican proteínas involucradas en reparación del DNA (Karanjawa and Lieber 2004).

4) Las DSBs no reparadas generan inestabilidad cromosómica, presente en la gran mayoría de los casos de cáncer, una patología asociada al envejecimiento (Lengauer, Kinzler et al. 1997).

Todas estas evidencias están interconectadas. De hecho, es muy frecuente que un síndrome de envejecimiento prematuro conlleve deficiencias en alguna vía de reparación de DNA, elevada incidencia de tumores y senescencia prematura *in vitro* (Lombard, Chua et al. 2005).

Todavía no está claro por qué la deficiencia de sólo algunas de las vías de reparación promueven fenotipos de envejecimiento prematuro. En algunos casos, puede deberse simplemente a que algunos mutantes no han sido estudiados con suficiente detalle como para revelar tales efectos. Sin embargo, los efectos del fondo genético también juegan un importante papel a la hora de modificar las posibles manifestaciones de los defectos en la reparación del DNA atribuidos a la edad (Bond and Singh 1987; Li, Vogel et al. 2007). Además, hay que recordar que hay genes implicados en reparación que están involucrados también en otros procesos celulares (ej.: Brca1 (Yang and Xia ; Thompson and Schild 2001; Mullan, Quinn et al. 2006)), de manera que los fenotipos achacados al envejecimiento podrían estar siendo potenciados por el mal funcionamiento de otras funciones celulares. Por tanto, es posible que el envejecimiento sea la consecuencia de un complejo entramado de interacciones entre el componente genético de un organismo y el condicionamiento que el estilo de vida y el ambiente ejercen sobre él. Las células deficientes en algunos de los principales factores de NHEJ, Ku 70 (Gu, Seidl et al. 1997), Ku 80 (Nussenzweig, Chen et al. 1996; Vogel, Lim et al. 1999), DNA-PKcs (Espejel, Martin et al. 2004), LigasaIV (Frank, Sekiguchi et al. 1998) y Xrcc4 (Gao, Sun et al. 1998), entran prematuramente en senescencia replicativa. Los ratones deficientes en Ku80 (Vogel, Lim et al. 1999) y DNA-PKcs (Espejel, Martin et al. 2004) muestran síntomas de envejecimiento prematuro. No hay estudios publicados acerca del envejecimiento de los ratones Ku70^{-/-} ni sobre XLF^{-/-}. Tampoco existen publicaciones sobre la deficiencia en Ligasa IV o en Xrcc4 en el envejecimiento porque la delección de estas proteínas es letal en el embrión (Frank, Sekiguchi et al. 1998; Gao, Chaudhuri et al. 1998; Barnes and Lindahl 2004). En cuanto al papel que las distintas polimerasas de DNA juegan en este contexto, sólo existen evidencias acerca de la polimerasa gamma mitocondrial, la cual es crítica para la protección frente al envejecimiento (Trifunovic, Wredenberg et al. 2004; Kujoth, Hiona et al. 2005). Esta Tesis y la del Dr. Daniel Lucas (del mismo laboratorio) son la primera evidencia de la función de la polimerasa μ en el envejecimiento. La senescencia de las células deficientes en la DNA polimerasa μ y el proceso de envejecimiento del animal *knockout* constituyen parte de nuestro proyecto de investigación.

IV. Modelos para el estudio de la función de la DNA polimerasa μ en la reparación de roturas de doble hebra.

La inactivación de NHEJ tiene como resultado una hipersensibilidad a la radiación ionizante e inestabilidad genómica (Bassing, Swat et al. 2002; Ma, Pannicke et al. 2002), debido a que no es posible reparar adecuadamente las roturas generadas en el DNA en ausencia de esta vía de reparación. Además, el mal funcionamiento de NHEJ provoca inmunodeficiencia severa combinada (SCID) (Zhu and Roth 1995) como consecuencia de la incapacidad de rellenar y sellar las roturas efectuadas de forma programada en la recombinación V(D)J que experimentan los linfocitos.

A pesar de su incapacidad para reparar DSBs, los ratones deficientes en NHEJ presentan una predisposición a desarrollar linfomas relativamente baja porque las células con roturas no reparadas son eliminadas por acción de P53 (Guidos, Williams et al. 1996; Nacht, Strasser et al. 1996; Frank, Sharpless et al. 2000; Gao, Ferguson et al. 2000). La inactivación de esta proteína reestablece el número de linfocitos pro-B, aunque NHEJ permanece inactiva y el desarrollo linfocitario continúa alterado (Frank, Sharpless et al. 2000; Gao, Ferguson et al. 2000; Zhu, Mills et al. 2002). Esto conduce a que las deficiencias combinadas de los principales factores de NHEJ con p53 supongan un desarrollo temprano de linfomas pro-B en estos modelos dobles *knockout* (Guidos, Williams et al. 1996; Nacht, Strasser et al. 1996; Vanasse, Concannon et al. 1999; Difilippantonio, Zhu et al. 2000; Frank, Sharpless et al. 2000; Gao, Ferguson et al. 2000; Lim, Vogel et al. 2000; Gladdy, Taylor et al. 2003), con excepción del ratón XLF^{-/-}p53^{-/-}, que desarrolla meduloblastoma pero tiene una baja incidencia de linfomas pro-B (Li, Alt et al. 2008).

Los mecanismos moleculares que provocan la transformación en linfocitos pro-B deficientes en NHEJ en un fondo genético p53^{-/-} ya han sido descritos (Difilippantonio, Petersen et al. 2002; Zhu, Mills et al. 2002; Gladdy, Taylor et al. 2003). Casi todos estos linfomas muestran amplificación de c-myc con las consecuentes anomalías citogenéticas, incluyendo la translocación no recíproca C12;15 y una translocación compleja, denominada *complicón*, que contiene las regiones amplificadas correspondientes a la cadena pesada de las inmunoglobulinas y a c-myc.

RATÓN DEFICIENTE EN POL μ .

Bertocci y cols. generaron un ratón deficiente en pol μ (Bertocci, De Smet et al. 2002) que muestra una reducción importante en el número de linfocitos B y una alteración en el reordenamiento de la cadena ligera de las inmunoglobulinas (Ig), con una significativa reducción en longitud de las uniones VJ (región CDR3) de la cadena ligera *kappa* (Bertocci, De Smet et al. 2003). Esto sugiere que pol μ participa en el procesamiento de los extremos de DNA durante el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas, pero de forma específica de *locus*. El modelo pol μ ^{-/-} generado paralelamente en el laboratorio del Dr. A. Bernad presentaba un fenotipo similar (Lucas, Lain de Lera et al. 2005).

Hasta hace no mucho tiempo se postulaba que μ tenía como único papel la reparación de un pequeño grupo de DSBs (revisado en (Paull 2005)), ya que las células deficientes en μ y/o λ no son altamente sensibles a la IR (Bertocci, De Smet et al. 2006). Además, *in vivo*, su función sólo se había demostrado en VDJ (Bertocci, De Smet et al. 2003). Sin embargo, nuestro grupo ha publicado recientemente (Lucas, Escudero et al. 2009) un trabajo en el que se sugiere que μ tiene un papel importante en la reparación de DSBs en otros contextos diferentes al de la recombinación VDJ, tanto en el sistema hematopoyético como en tejidos no hematopoyéticos. El ratón $\mu^{-/-}$ generado en nuestro laboratorio presenta otra serie de defectos linfohematopoyéticos, como celularidad sanguínea reducida, disminución severa en linfocitos B y alteraciones en el reordenamiento cadena ligera (V_L) y disminución del número de plaquetas (los linfocitos T constituyen el único linaje cuya celularidad no se ve reducida). Además, el ratón $\mu^{-/-}$ es hipersensible a la radiación γ , tras la cual se observa un incremento de DSBs dentro y fuera del sistema linfohematopoyético (aspecto desarrollado en esta tesis). Demostramos también otros dos puntos adicionales que se desarrollaron en la presente tesis: 1) los fibroblastos embrionarios murinos (MEFs, *Mouse Embryonic Fibroblast*) $\mu^{-/-}$ entran en senescencia prematura y son hipersensibles al estrés oxidativo, y 2) la deficiencia en μ confiere inestabilidad genética tras radiación γ moderada, *in vitro* e *in vivo*.

Sorprendente y contrariamente a lo que se podría esperar *a priori*, el ratón $\mu^{-/-}$ generado en nuestro laboratorio es más longevo: vive más tiempo, su piel presenta un mayor espesor de la grasa subcutánea, preserva los cocientes de células CD4/CD8 en sangre periférica y médula ósea (Lucas, Tesis Doctoral 2005; Escudero B et al., 2011; artículo enviado) y presenta una habilidad cognitiva menos afectada por el envejecimiento (Lucas D, Delgado-García J. M. et al, Escudero, B., artículo en revisión) en comparación con el control. Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral es profundizar en el fenotipo de envejecimiento del ratón $\mu^{-/-}$.

RATÓN DEFICIENTE EN P53.

P53 es uno de los supresores de tumores más importantes en mamíferos. De hecho, más del 50% de los tumores humanos tienen mutaciones en componentes de la vía de P53 (Hollstein, Sidransky et al. 1991). En los modelos murinos, la delección de p53 conlleva una elevada incidencia de tumores (Donehower, Harvey et al. 1992; Jacks, Remington et al. 1994) y defectos en la apertura del tubo neural durante el desarrollo embrionario genético (Armstrong, Kaufman et al. 1995; Sah, Attardi et al. 1995) como características fenotípicas más relevantes. Además, los MEFs procedentes de los ratones $p53^{-/-}$ se immortalizan rápidamente en cultivo, evadiendo la senescencia que experimentan las células control (wt, *wild type*) (Harvey, Sands et al. 1993).

1. Tumorogénesis.

Los ratones $p53^{-/-}$ son altamente propensos a desarrollar cáncer en los primeros meses después del nacimiento (Donehower, Harvey et al. 1992). Esto mismo fue respaldado en un segundo trabajo, que generó otro ratón $p53^{-/-}$ (con el alelo mutante diferente) (Jacks, Remington et al. 1994). Este grupo clasificó los tumores desarrollados como consecuencia de la deficiencia parcial y total en p53. Los $p53^{+/-}$ desarrollan principalmente sarcomas, mientras que los $p53^{-/-}$ desarrollan mayoritariamente linfomas,

principalmente afectando al timo. Estos timos tumorales contienen linfocitos T CD4⁺CD8⁺ (dobles positivos) (Jacks, Remington et al. 1994), lo que sugiere que la transformación se da en linfocitos relativamente inmaduros (von Boehmer 1988).

2. Defectos en el Tubo Neural.

Los defectos del tubo neural (NTD, *Neural Tube Defects*) son un grupo de malformaciones congénitas resultado de un fallo en el cierre del tubo neural durante el desarrollo embrionario. En humanos, constituyen uno de los defectos más comunes en los nacimientos humanos, con una prevalencia de aproximadamente de 1 de cada 1000 nacidos vivos en Estados Unidos (Copp, Greene et al. 2003). Los tipos más comunes de NTD son anencefalia/exencefalia y espina bífida, resultado de un fallo en el cierre del tubo neural en las regiones craneal y espinal, respectivamente. La etiología de los NTDs comprende factores ambientales y genéticos (Padmanabhan 2006). Aunque no se ha identificado ninguna mutación genética como única responsable de un NTD en humanos, la investigación con modelos animales ha identificado más de 190 genes cuya delección causa estas anomalías (Harris and Juriloff 2007).

El grupo del doctor Tyler Jacks demostró (Sah, Attardi et al. 1995) que una significativa proporción (8-16%) de los embriones deficientes en p53 presentan exencefalia (proporción que varía en función del fondo genético (Armstrong, Kaufman et al. 1995; Sah, Attardi et al. 1995). El doctor Armstrong y cols. (Armstrong, Kaufman et al. 1995) observaron que casi la totalidad de los embriones deficientes en p53 con exencefalia eran hembras (20 de 21). El conjunto de los datos sugiere que la exencefalia está significativamente ligada a la deficiencia en p53 (cuya penetrancia, sin embargo, no es completa) y, casi exclusivamente, a hembras, como ocurre en humanos y en otros modelos animales *knockout* (Seller 1987; Seller 1995; Harris and Juriloff 2007).

Se ha observado cooperación entre factores de reparación del DNA y durante el desarrollo embrionario. Un ejemplo es el de la proteína XPD, perteneciente a la vía NER, cuya delección incrementa la exencefalia en los embriones p53^{-/-} (Cheo, Meira et al. 1996). Ejemplos diferentes los constituyen factores de NHEJ. La delección de LigIV/Xrcc4 es letal en el embrión debido a defectos en la neurogénesis, pero la delección simultánea de p53 permite la viabilidad de estos embriones (Frank, Sharpless et al. 2000; Gao, Ferguson et al. 2000).

RATÓN DEFICIENTE EN POL μ Y P53.

El ratón deficiente en pol μ muestra una reducción importante en el número de linfocitos B y una alteración en el reordenamiento de la cadena ligera de las inmunoglobulinas. Pese a este defecto en el desarrollo linfocitario, no se muestra proclive al desarrollo de linfomas (ni de ningún otro tipo de tumor), ni de manera espontánea ni inducida (Lucas, Tesis Doctoral 2005).

Debido a la estrecha relación existente entre deficiencias en NHEJ y la de p53, y considerando que un entorno deficiente en p53 facilitaría la caracterización de cualquier posible acción de pol μ relacionada con un proceso tumoral, decidimos generar el doble *knockout* μ ^{-/-}p53^{-/-}. En este trabajo, investigamos como afecta la deficiencia en pol μ a los ratones deficientes en p53, tanto en el desarrollo embrionario como en la tumorigénesis.

Objetivos

I. Investigación de la función de la DNA polimerasa μ (pol μ) en la reparación global de DSBs.

I.1. Análisis de la función de pol μ en la reparación de extremos no homólogos (NHEJ), *in vitro* e *in vivo*.

I.2. Estudio del efecto de la deficiencia de pol μ en la reparación por recombinación homóloga (HR).

I.3. Análisis del papel de pol μ en el envejecimiento.

II. Caracterización de la cooperación entre pol μ y p53.

Materiales y Métodos

I. MODELOS ANIMALES:

En el transcurso de esta tesis hemos usado 2 líneas de ratones diferentes:

- 1) La línea pol μ , en la que el ratón *knockout* fue generado en la cepa híbrida BALB/C x 129Sv ((Lucas, Tesis Doctoral 2005;(Lucas, Lain de Lera et al. 2005)).
- 2) La línea pol μ :p53, obtenida tras la derivación de la línea pol μ a la cepa C57BL/6 y el cruce de la nueva línea derivada con ratones deficientes en p53 del mismo fondo genético (B6.129S2-Trp53^{tm1Tyj}/J; Jackson labs, Maine US, número de stock: 002101).

Los animales siempre han sido mantenidos en condiciones estándar: aire filtrado HEPA, temperatura estable a 22°C, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y comida y agua esterilizadas por irradiación *ad limitum*. La presencia de patógenos se ha controlado de manera rutinaria (condiciones SPF, *Specific Pathogen Free*).

Tanto la totalidad de los experimentos como el sacrificio de los animales se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación española (Real Decreto 223/88 y Orden Ministerial 13-10-89 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para la protección de animales de laboratorio) y con la convención europea (ETS-123) sobre la protección de mamíferos vertebrados usados en investigación.

II. LÍNEAS CELULARES Y CÉLULAS PRIMARIAS:

1. RAMOS.

Células Ramos, un linfoma de Burkitt humano (proporcionadas por el Dr.Carlos Martínez, DIO-CNB). Para la obtención de las Ramos- μ y las Ramos-DN se clonó el cDNA de la polimerasa humana o de su dominante negativo (respectivamente) en el vector retroviral pLZR-IRES-gfp (Abad, Serrano et al. 2002) y el producto del clonaje se empleó para la transducción de las Ramos. Las Ramos-EV son el resultado de la transducción con el vector vacío (*empty vector*).

Las células Ramos han sido mantenidas en medio RPMI 1640 completo (Sigma®, R8758), suplementado con aminoácidos no esenciales (Termo Scientific®, SH30238.01), L-glutamina 2mM (Lonza®, 17-605E), piruvato sódico 1mM (Lonza®, BE13-115E), penicilina/ estreptomycin (10⁵ U de cada antibiótico en 1mL, Lonza®, DE 17-602E), HEPES 10mM (Cambrex®, BE17-737E) y 10% FCS (Sigma®, F7524).

2. CHO (Chinese Hamster Ovary).

Línea celular obtenida de ovario de *hamster* chino, concretamente CHO-K1 (Guirouilh-Barbat, Huck et al. 2004). Línea A7. Las CHO-DN y CHO-EV se obtuvieron de la misma forma que las Ramos-DN y EV, respectivamente.

Para el mantenimiento en cultivo, se empleó α -MEM (*alpha Minimum Essential Medium*, 22561-021), suplementado con penicilina/ estreptomycin (10⁵ U de cada antibiótico en 1mL, Lonza®, DE 17-602E), y 10% FCS (Sigma®, F7524).

3. MEFs.

Hemos empleado fibroblastos embrionarios murinos (MEFs: *Murine Embryonic Fibroblasts*) procedentes de las dos líneas de ratones citadas más arriba. Los de BalbC/129sv fueron obtenidos de embriones extraídos 14.5 días post-coito (dpc) según protocolos estándar y congelados en pase 2 (Lucas, Tesis Doctoral 2005). Después de la descongelación a 37°, cada vial se plaqueó en DMEM (*Dubelcco's minimal essential medium*, Sigma® D5796) con 10% de FCS (Sigma®, F7524), penicilina/ estreptomycin (10⁵ U de cada antibiótico en 1mL, Lonza®, DE 17-602E), L-glutamina 2 mM (Lonza®, 17-605E), piruvato sódico 1mM (Lonza®, BE13-115E) y aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Termo Scientific®, SH30238.01). Al día siguiente, hicimos la primera siembra, 10⁶ células en placas de 10 cm de diámetro; y se levantaron y contaron cada 3-4 días (protocolo 3T3, (Todaro and Green 1963)). Por tanto, el que sería el pase 0 es en realidad el pase 3 (y así lo tuvimos en cuenta en nuestros experimentos). Para simular las condiciones fisiológicas se empleó un incubador tri-gas (N₂, O₂ y CO₂) (Termo Urcoa Erloss® modelo *Forma Series II Water Jacked Incubator Model 3141*), que compensa la reducción en la presión parcial de oxígeno con nitrógeno.

Los MEFs de fondo C57BL/6 fueron obtenidos a partir de embriones extraídos a estadio 13.5 dpc. Tras extraer e individualizar los embriones, los fotografiamos en la lupa (Leica® MZ FL III) para dejar constancia de las posibles malformaciones embrionarias. A continuación, fijamos las cabezas en PFA 4% (para incluirlas posteriormente en parafina) y separamos las vísceras para genotipar los embriones. El resto de cada uno de los cuerpos fue disgregado en tripsina (Gibco®, 25200-072) al 0,25% (en hielo durante 2,5 horas) y sembrado individualmente para la obtención de los MEFs. Se mantuvieron en cultivo siguiendo el protocolo 3T3.

4. LINFOCITOS B.

Hemos trabajado con linfocitos B obtenidos a partir de bazo. El proceso de purificación de dichas células consistió en lo siguiente:

1. Disgregación: colocamos el bazo en un cestillo de nylon de 70 µm de diámetro de poro (BD Falcon®, 352350) y lo machacamos con el émbolo de un jeringuilla de 2 mL. Lavamos el filtro con PBS-2% FCS y recogemos el resultado en la misma solución.
2. Lisis de eritrocitos: resuspendemos el pellet en 3 mL de solución de lisis (ACK Lysing Buffer, BioWhittaker®, 10-548E) y lo incubamos a RT durante 3 minutos. Paramos la reacción añadiendo 10 mL de PBS-2% FCS y centrifugamos (1200 rpm, 5 minutos).
3. Resuspendemos el pellet en 100 µL de PBS-2% FCS y 10 µL de anti-CD43 marcado con bolas magnéticas (MACs®, 130-049-801) por cada 10⁷ células. Incubamos durante 30 minutos a RT, en oscuridad. Lavamos el anticuerpo añadiendo 5 mL de PBS-2% FCS. Centrifugamos y resuspendemos en 500 µL de PBS-2% FCS.
4. Selección de linfocitos B: pasamos la suspensión celular por la columna magnética (MACs®, 130-042-401), dispuesta en el soporte correspondiente (Miltenyl Biotech® GmbH, 018031), y recogimos el eluido (selección negativa: los linfocitos T se quedan en la columna). Lavamos 3 veces con 3 mL de PBS-2% FCS para eluir el mayor número de células posible.

5. Resuspendemos el *pellet* (10^6 células/mL) en RPMI 1640 (Sigma®, R8758), con los siguientes complementos: 10% de FCS (Sigma®, F7524), penicilina/ estreptomicina (10^5 U de cada antibiótico en 1mL, Lonza®, DE 17-602E), L-glutamina 2 mM (Lonza®, 17-605E) piruvato sódico 1mM (Lonza®, BE13-115E), aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Termo Scientific®, SH30238.01), HEPES 10mM (Cambrex®, BE17-737E), beta-mercaptoetanol 0,55 mM (Merck®, M7522), interleuquina-4 a 20 ng/mL (R&D Systems®, 404-ML) y anti-CD40 a 1 μ g/mL (Biosciences®, 16-0402-86).

5. MÉDULA ÓSEA:

La extracción de médula ósea se realizó haciendo pasar PBS (5mL, aprox.) con una jeringa y aguja G21, a través del fémur en condiciones de esterilidad (material esterilizado y procedimiento en campana de flujo laminar). Se lisaron los eritrocitos de la suspensión celular con cloruro amónico al 0,85% y el resto de las células sembraron a 2 millones por mililitro en Myelocult 5300 con 20% FBS, 10% de medio condicionado de Wehi (IL-3) y 15 ng/mL SCF (Stem Cell Factor).

III. TÉCNICAS EXPERIMENTALES.

1. GENOTIPADO.

Obtuvimos el DNA genómico de la cola, para lo que cortamos 0,2 cm de tejido y lo procesamos con *Nucleospin*® (Macherey-Nagel, 740952250), según las instrucciones del fabricante. Empleamos 1 μ L (unos 50 ng) del DNA extraído para la reacción de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Todas las reacciones se hicieron en 25 μ L y contenían los siguientes reactivos: tampón de PCR 10X (200 mM Tris pH9, 1,5 mg/mL seroalbúmina bovina (BSA), sulfato amónico 160 mM, cloruro magnésico 35 mM) y la polimerasa Taq (Roche, 11418 432 001) a 0,04U/ μ L.

1.1. GENOTIPADO PARA POL μ .

Se emplearon 3 cebadores (en inglés, *primers*): 2486 (5'-GGC CTG TCA CAG TGC AA TAA-3'), 3149 (5'-ggC TCA gCT ACC TgC AAA AA-3') y ppNT (5'-gTA gCg CCA AgT gCC AgC-3'). El 2486 y el 3149 amplifican el alelo wt de pol μ , mientras que el 2486 y el ppNT amplifican el alelo truncado. Se adicionaron a la mezcla de reacción de PCR en una concentración de 0,4 μ M. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 1º) 94°C durante 5min, 2º) 94°C durante 30 seg, 3º) 53°C durante 30 seg, 4º) 72°C durante 45 seg, 4º) 35 ciclos de los pasos 2-4, y, finalmente 5º) 72°C durante 6 min.

1.2. GENOTIPADO PARA P53.

Se emplearon 3 *primers*: IMR0036 (5'-ACA GCG TGG TGG TAC CTT AT-3'), IMR0037 (5'-TAT ACT CAG AGC CGG CCT-3') y IMR0038 (5'-CTA TCA GGA CAT AGC GTT GG-3'). El IMR0036 y el IMR0037 amplifican el alelo wt de pol μ , mientras que el IMR0037 y el IMR0038 amplifican el alelo truncado. Se adicionaron a la mezcla de reacción de PCR en una concentración de 0,08 μ M (IMR0036) y 0,15 μ M (IMR0037 y IMR0038). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 1º) 94°C

durante 3 min, 2º) 94°C durante 30 seg, 3º) 66°C durante 1 min, 4º) 72°C durante 90 seg, 4º) 35 ciclos de los pasos 2-4, 5º) y, finalmente 5º) 72°C durante 2 min.

2. DETERMINACIÓN DEL SEXO EN EMBRIONES.

Extrajimos el DNA de las vísceras de embriones de día 13.5 postcoito, para lo que procesamos dichas vísceras con *Nucleospin*® (Macherey-Nagel, 740952250), según las instrucciones del fabricante. El DNA extraído se sometió a una reacción de PCR (unos 50 µg de DNA por reacción) para amplificar el gen ZFY2 (región específica del cromosoma Y) y el gen GAPDH (control endógeno). Para el ZFY2, los *primers* empleados fueron Zfy Fw (5'-tgg aga gcc aca agc taa cca-3') y Zfy Rev (5'-tcc cag cat gag aaa gat tct t-3') (Mardon and Page 1989); y, para el control, GAPDH Fw (5'-GGAGATTGTTGCCATCAACG-3') y GAPDH Rev (5'-GTCTCGCTCCTGGAAGATGG-3').

Se empleó el mismo tampón de PCR y la misma polimerasa que en las reacciones de genotipado, con una concentración de los primers de 0,4 µM. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 1º) 95°C durante 5 min, 2º) 92°C durante 30 seg, 3º) 59°C durante 1 min, 4º) 72°C durante 30 seg, 4º) 40 ciclos de los pasos 2-4, y 5º) 72°C durante 10 min.

3. WESTERN BLOT.

Los anticuerpos empleados han sido: anti-p19 (dilución 1:1000, Abcam®, ab80-100), anti-p16 (dilución 1:500, Santa Cruz Biotechnology®, sc-1207), anti-p21 (dilución 1:500, Santa Cruz Biotechnology®, sc-6246), anti-Bax (dilución 1:1000, Santa Cruz Biotechnology®, sc-526), anti-γH2AX (dilución 1:1000 Upstate®, 07-164) anti-gamma-adaptina (laboratorios Transduction®, 610385), anti-beta-actina (dilución 1:5000, Abcam®, ab8226-100), anti-H3 (dilución 1:5000, Abcam®, ab8226-100). Como anticuerpos secundarios, se emplearon anti-IgG de ratón o de conejo (dilución 1:5000, Dako®, P0447 y P0448, respectivamente), según el caso.

4. HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH: FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION):

Hemos realizado dos variantes de FISH: FISH telomérico y *painting* cromosómico.

Preparación de las metafases:

Las metafases se prepararon de dos formas diferentes, según el caso: 1) de manera directa, para el estudio *in vivo* (médula ósea), y 2) a partir del cultivo celular (células Ramos, médula ósea y MEFs).

1) En el método directo, se incuban las células extraídas de médula ósea a 37°C durante 30 min en tubos Falcon de 15 mL con una solución hipotónica (10 mL de KCl 0,56%, 100 µL de tripsina-EDTA 10X y 25 µL de colcemida (Gibco®, 15210-040) a 10 µg/mL). Posteriormente, se fijan 3 veces en metanol: ácido acético glacial (3:1) fresco.

2) Para la preparación de metafases a partir del cultivo celular, se adiciona colcemida 0,1 µM al medio durante un tiempo variable en función del tipo celular (1,5 h en el caso

de las células Ramos, 2h en el caso de las células de médula ósea y 4 horas en el caso de los MEFs). A continuación (y tras la tripsinización en el caso de los MEFs), las células se centrifugan durante 8 min a 800 rpm y se resuspenden en 10 mL de solución hipotónica (citrato sódico 0,03 M en el caso de los MEFs, y KCl 0,56% en el caso de las células Ramos y de médula ósea).

Captura de imágenes:

La captura de imágenes se llevó a cabo con un microscopio de fluorescencia *Leica DMR* con un objetivo 100X y una cámara *Nikon 1200*. La superposición de las imágenes procedentes de cada fluorocromo (sonda/DAPI) se realizó con el programa informático *ImageJ*. La estadística (gráficos, media aritmética, desviación estándar y *t* de Student) se resolvió mediante el empleo del programa *Prism*. Se consideró un valor significativo si $p < 0,05$.

4.1. FISH TELOMÉRICO.

Las metafases son hibridadas con una sonda de PNA (*Peptide Nucleic Acid*) telomérica (Eurogentec S.A.; PNAPC80017/PV92827; secuencia: LLCCCTAACCCTAACCCTAA) y una centromérica (Eurogentec S.A.; PC61124/PV69331; secuencia: LLATTCGTTGGAAACGGGA) conjugadas con un fluorocromo (FITC para la teloméricas y Cy3 para la centromérica) (Zijlmans, Martens et al. 1997).

En cada una de las metafases, se contó el número existente de cada una de las aberraciones (estructurales) cromosómicas consideradas, clasificándolas bajo los siguientes criterios:

- 1) Fusión robertsonianas: unión de 2 cromosomas por sus brazos p, con presencia o ausencia de 2 señales teloméricas solapantes en el punto de unión.
- 2) Cromosoma dicéntrico: unión de 2 cromosomas por sus brazos largos o mediante una unión p-q, pudiendo verse 2 centrómeros separados claramente en la estructura (con o sin telómeros en el punto de unión).
- 3) Radiales e intercambios complejos.
- 4) Roturas: la ausencia de cada telómero se contabilizó como una rotura; una cromátida con un gap = 1 rotura; dos cromátida (o un cromosoma) con gap = 2 roturas.
- 5) Anillo: cromosoma cuyos brazos que están unidos entre sí y no presentan telómeros en el punto de unión. Debido a la facilidad de confusión visual en muchos casos entre un anillo y una rotura cromosómica, los anillos son incluidos en las roturas en el análisis estadístico de los datos.

4.2. PAINTING CROMOSÓMICO.

Realizamos dos experimentos diferentes en células de médula ósea. Para el estudio de sensibilidad a radiación γ , hicimos un *painting* del cromosoma 6. Para el estudio del mantenimiento de la estabilidad cromosómica durante el envejecimiento, los cromosomas estudiados fueron el 1, el 2 y el 3. Las metafases fueron hibridadas con sondas WCP (*Whole Chromosome Paint*) (Cambio Ltd (UK)), siguiendo las instrucciones del fabricante. Dichas sondas están conjugadas con Cy3 (cromosomas 1 y 6), FITC (cromosoma 2) o biotina (cromosoma 3), conjugada con avidina marcada con Cy5.

En cada una de las metafases, se contó el número existente de cada una de las aberraciones cromosómicas que esta técnica nos permitió considerar, clasificándolas bajo los siguientes criterios:

- 1) Traslocaciones: cuando en un mismo cromosoma se aprecias dos señales diferentes: la de la sonda (roja (Cy3), verde (FITC) o amarilla (Cy5)) y la de la contratinción (azul). El concepto “cromosoma” incluye cualquiera de las aberraciones estructurales anteriormente citadas.
- 2) Roturas: cuando se aprecia una delección o un *gap* (contabilizado igualmente si se producía en una sola cromátida o en la totalidad del cromosoma, pues en muchas ocasiones era imposible discernir).

5. CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS):

Los diferentes análisis se realizaron en el citómetro *Cytomics FC 500* (Beckman® Coulter).

5.1. ANÁLISIS DE ROS.

a) En MEFs:

Sembramos 10^6 células en placas de 10 cm de diámetro. 24 horas después, se levantaron y se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo (500×10^3 células/mL) con cada uno de los reactivos: 1) DCFDA (5-(6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester) (Invitrogen®, C-369) 5 μ M; 2) MTG (Mitotraker Green) 50 nM (Molecular Probes®, M7514) y 3) TMRM (tetramethylrhodamine) 5 nM (Sigma-Aldrich®, T5428). Se incubaron durante 2 horas a 37°C en sendos incubadores (20 y 5% O₂), protegidos de la luz.

b) En timo y bazo:

Disgregamos los órganos como se explica en el apartado 2.4. Lavamos el *pellet* y lo resuspendimos en HBBS, dejando la solución a 10^6 células/mL. Añadimos DCF, a una concentración final de 5 μ M en ambos casos, e incubamos la mezcla a 37°C (en el incubador de cultivos convencional) durante 1h, en oscuridad.

5.2. ANÁLISIS DE CICLO CELULAR.

Analizamos el ciclo celular de hígados de ratones viejos, para lo que disgregamos los órganos en PBS-2% FCS. La suspensión celular se incubó en una solución con RNasa (10 mg/mL) y de ioduro de propidio (0,05%) durante 30 minutos, a 37 °C, en oscuridad.

5.3. ANÁLISIS DE POBLACIONES DE LINFOCITOS.

En caso de linfoma aparente, los órganos fueron disgregados como se explica en el apartado 2.4. La suspensión celular (en PBS-2% FCS) se mantuvo en hielo hasta el momento de ser analizada en el citómetro. Se incubó durante 30 minutos en hielo con los siguientes anticuerpos unidos a fluorocromos: CD3-FITC, CD4-PE (*phycoeritrin*), CD8-PECy7 (*phycoeritrin-cyanin7*) y B220-Alexa 647.

6. INMUNOFLUORESCENCIA para la detección de γ -H2AX.

Las suspensiones celulares (esplenocitos y médula ósea) se depositaron en portaobjetos *superfrost* (Thermo Scientific®, 1800AMNZ) mediante centrifugación durante 3 minutos a 800 rpm. Las células adheridas fueron fijadas en paraformaldehído al 4% (30 minutos, 4 °C). Tras 3 lavados de 5 minutos en PBS-0,1% de Tween20, los portaobjetos se bloquearon (PBS-0,1% Tween20-10% BSA) durante 1 h, después de la cual se incubaron con una solución de anti- γ H2AX (dilución 1:100, Upstate®, 07-1590), se lavaron de nuevo, y se incubaron 30 min a RT en una solución de anti-IgG de conejo. Tras 3 lavados como los anteriores, las preparaciones se montaron portas con Vectashield (laboratorios VECTOR®) con DAPI (*4,6-diamidino-2-phenylindole*) para contrateñir los núcleos celulares. Sellamos las muestras con laca de uñas.

Las imágenes se adquirieron en el microscopio confocal Leica DM2500. Las imágenes (en formato TIFF) se analizaron con el programa *ImageJ*.

7. SISTER CHROMATID EXCHANGE (SCE).

Añadimos bromodeoxiuridina (BrdU) (Sigma®), 65 μ M, al medio de cultivo durante el tiempo equivalente a 2 ciclos de duplicación celular: 36 horas para las CHO, 48 horas para las Ramos, 52 horas para los MEFs y 48 h para los linfocitos B (purificados y estimulados con IL-4/CD40). Se preparan las metafases de la forma descrita anteriormente, con la salvedad de que la concentración de colcemida es inferior (0,03 μ g/mL). Una vez extendidas las metafases, los portaobjetos se incubaron 15 minutos en una solución de 0,5 μ g/mL de Hoetch 33258 en SSC 2x y después se sometieron a luz ultravioleta (*UV Stratalinker 1800*, Stratagene®) durante 30 minutos. La tinción de las metafases con un anticuerpo anti-BrdU anticuerpo (Becton Dickinson®, 347583) se llevó a cabo según el protocolo indicado por el fabricante.

La captura y el procesamiento de las imágenes, así como el análisis estadístico de los datos, se realizaron de la misma forma que en las técnicas de FISH.

8. ARRAYS DE EXPRESIÓN.

Aislamiento de RNA.

Aislamos RNA total de hígado mediante disgregación mecánica en TRI® REAGENT (Sigma®, T9424) siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicho RNA se digirió con DNaseI y se lavó para eliminar los restos de DNA y proteínas. La integridad y la concentración del RNA se determinó sometiendo las muestras a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% y midiéndolas en un Nanodrop (espectrofotómetro ND-1000, Agilent®).

Preparación de las muestras, hibridación del *microarray*:

Las muestras fueron amplificadas e hibridadas en *Whole Mouse Genome Microarray 4 x 44K* (G4122F, Agilent® Technologies).

Amplificación y marcaje:

El RNA fue amplificado siguiendo el protocolo de la casa comercial de los *microarrays* (*One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol* (Agilent®)). Hicimos la retrotranscripción del RNA usando el primer promotor T7 y MMLV-RT. El cDNA obtenido fue transformado en RNA con la T7 RNA polimerasa, que incorpora citosina marcada con Cianina 3 (Cy3) a la adena a medida que copia el molde.

Hibridación y lavado de las muestras:

Se diluyen 1,65 µg de cada muestra marcada en el tampón de hibridación de la casa comercial (*GEx Hybridization Buffer HI-RPM*) y se incuban durante 17 horas a 65°C en un horno de hibridación (G2545A, Agilent®) a 10 rpm. Los *arrays* fueron lavados siguiendo las instrucciones del fabricante.

Adquisición y análisis de imagen:

Los *arrays* se escanearon la una resolución de 2 µm en el *scanner* de la casa comercial (G2565BA, Agilent®), y las imágenes proporcionadas por el scanner fueron analizadas con el *software Feature Extraction version 9.5.3.1* (Agilent®).

9. IRRADIACIÓN DE CÉLULAS Y ANIMALES.

Expusimos los animales y las células a dosis únicas de radiación γ . Los animales, las células Ramos y los MEFs fueron expuestos a una dosis de 5 Gy; los cultivos de médula ósea, a 4 Gy para el análisis de estabilidad cromosómica mediante FISH y a 5 Gy para el análisis de los niveles de γ H2AX; los linfocitos, a 5 Gy para el análisis de los niveles de γ H2AX mediante inmunocitoquímica y a 8 Gy para el análisis de dichos niveles mediante Western Blot; los MEFs, a 5 Gy.

10. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL:

Aislamos RNA total de órganos (cerebro, hígado) mediante disgregación mecánica en TRI® REAGENT (Sigma®, T9424) siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de cDNA se realizó con un kit de transcripción reversa (*Reverse Transcription kit*, Promega®, A3500), siguiendo las pautas marcadas por la casa comercial.

La expresión génica fue evaluada mediante dos tipos de PCR cuantitativa: PCR a tiempo real (RT-PCR, *Real Time PCR*) o mediante *TaqMan*, una variante que emplea sondas del gen de interés para aumentar la especificidad de la RT-PCR). Ambos tipos de PCR cuantitativa se realizaron usando el Applied Biosystems® 7000 *Sequence Detecting System*. Dicha expresión se cuantifica como nivel de transcritos y se normaliza frente a un control estándar (36B4 ó beta-actina, respectivamente). Para las RT-PCRs, se empleó la mezcla de reacción *Power SYBER Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems®, 4367659) y los cebadores (*upstream* y *downstream*) específicos de cada gen (ver tabla al final de “materiales y métodos”). Para los ensayos *TaqMan*, empleamos el tampón de reacción *TaqMan 2X PCR Master Mix* (Applied Biosystems®, KP0054), y, en cada caso, un *TaqMan gene assay* específico (que contiene una sonda y un par de cebadores para el gen correspondiente). El nivel de expresión génica del órgano wt o $\mu^{-/-}$ se corresponde con el valor promedio de cada una de las muestras (10ng del cDNA procedente de cada cerebro y 100 ng en el caso del hígado), cuya medición se hizo por triplicado. La cantidad de cada transcrito es $2^{-(\Delta ct)}$, donde Δct es el valor normalizado frente al control (36B4 o beta- actina).

Primers y sondas Taqman usadas en esta Tesis:

gen	oligos/sonda
C5a	5'- TGTGGGTGACAGCCTTCG A-3' y 5'- CCGCCAGATTTCAGAAACCAG- 3'
C5l2	5'- TTTGCTGGACCCCTTATCAC-3' y 5'- GATACCTTGGTCACCGCACT- 3'
C3a	5'- TCATCGAAACGTGAGAACCG-3' y 5'- AATACGGGCACACACATCACA- 3'
36B4	5'-AGATGCAGCAGATCCGCAT -3' y 5'- GTTCTGCCCATCAGCACC -3'
C1qa	Mm00432142_m1
p21	Mm00432448_m1
Perp	Mm00480750_m1
Ddit4l	Mm00513313_m1
Pten	Mm00477210_m1
Egln3	Mm00472200_m1
Bid	Mm00432073_m1
Acin1	Mm000479895_m1
Gfap	Mm00546086_m1
Atp5a1	Mm00431960_m1
Mrpl28	Mm00465919_m1
Mrps12	Mm00488728_m1
Timm17a	Mm00809812_m1
Ndufa10	Mm00600325_m1
β-Actina	4352933-E
Cox2	Sonda TaqMan: TCATGAGCAGTCCCCTCCCTAGGACTTAA-3' (5' FAM 3' TAMRA) Cebadores: 5'-TTTCATCTGAAGACGTCCTCCA-3' y 5'-GGCCTGGGATGGCATCA-3'

11. TÚNEL.

Este ensayo se basa en la adición de nucleótidos (marcados con fluorescencia) por TdT a las roturas que las DNAsas celulares generan durante la apoptosis (Moore, Donahue et al. 1998). Para marcar las células apoptóticas, empleamos el *In Situ Death Detection Kit* (Roche®, 1 684 795), siguiendo las instrucciones del fabricante. La captura de imágenes se hizo en el microscopio confocal Leica DM2500.

12. ARRAYS DE CGH.

Aislamiento de DNA.

Aislamos el DNA de las muestras haciendo uso de DNAZOL® *Reagent* (Invitrogen®). Se digirió el DNA con Alu I y Rsa I (2 h at 37 °C). Las enzimas fueron inactivadas a 65^a durante 20 min.

Preparación de las muestras, hibridación del microarray y adquisición de imagen.

Para el marcaje, se añadió 5 µL of *random primers* a las muestras y la mezcla se incubó a 65 °C durante 20 minutos, periodo tras el cual se adicionó el resto de la mezcla de reacción: 1 µL de la polimerasa Exo-Klenow (5 U/µL), 0,5 de dNTPs 10µ M y 3-dUTP

(a las muestras control, DNA de la cola del mismo ratón del que procede el tumor) ó 5-UTP- cyanina (a las muestras tumorales). El DNA se purificó mediante los filtros *Microcon YM-30 filters (Millipore)*. Para la hibridación, los DNAs marcados con Cy3 ó Cy5 se mezclaron e hibridaron con el *microarray* de Agilent® (*Sure Print G3 Mouse CGH Microarray (4x180K)*).

Los arrays fueron lavados y secados de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis Enzymatic Labeling, Agilent® Technologies*). Las imágenes fueron digitalizadas a 3 micras de resolución en el scanner de la casa comercial de los *arrays* (G2565BA, Agilent® *Technologies*), usando los parámetros asignados por defecto para los *arrays* de CGH en formato 4X44K. El análisis se realizó haciendo uso del software del mismo fabricante (*Feature Extraction software v10.7*) y de DNA Analytics (Agilent®) en colaboración con el Dr. Javier Suela de la empresa NIMGenetics S.L.

Resultados

I. PAPEL de la DNA POLIMERASA μ en la REPARACIÓN de DSBs.

A. Función de la DNA polimerasa μ en la reparación de extremos no homólogos. Papel en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica en condiciones de estrés genotóxico.

Se ha demostrado que pol μ interviene en NHEJ *in vivo* en el proceso de recombinación V(D)J (Bertocci, De Smet et al. 2003). Además, existen dos factores principales que sugieren que pol μ juega un papel en otros procesos biológicos: 1) pol μ se expresa en una amplia variedad de tejidos (aunque de manera más acusada en órganos linfoides secundarios) (Dominguez, Ruiz et al. 2000; Lucas, Lain de Lera et al. 2005); 2) el ratón $\mu^{-/-}$ generado en nuestro laboratorio presenta una reducción de casi todos los linajes celulares del sistema linfohematopoyético (en sangre periférica), especialmente en linfocitos B (Bertocci, De Smet et al. 2003; Lucas, Escudero et al. 2009). En comparación con el wt, el número de linfocitos B en el ratón $\mu^{-/-}$ es 4.9 veces inferior ($p=0,001$), el número de monocitos se reduce 2, 2 veces ($p=0,01$) y el de plaquetas, 1,6 veces ($p=0,01$). El único linaje hematopoyético no afectado es el de linfocitos T.

Por norma general, las células deficientes en factores pertenecientes a vías de reparación del DNA son sensibles a agentes genotóxicos. La sensibilidad a radiación ionizante y al estrés oxidativo son los dos parámetros que hemos analizado para el estudio de la función de pol μ en las roturas de doble hebra.

1. SENSIBILIDAD DE LAS CÉLULAS DEFICIENTES EN POL μ A RADIACIÓN IONIZANTE.

El agente más frecuentemente utilizado para la inducción de DSBs y, en consecuencia, aberraciones cromosómicas, es la radiación ionizante ((Natarajan 1993); revisado en (Pfeiffer, Goedecke et al. 2000)). Además, los ratones deficientes en los principales factores de NHEJ y el ratón $\mu^{-/-}$ muestran hipersensibilidad a radiación γ (Bassing and Alt 2004; Meek, Gupta et al. 2004; Meek, Dang et al. 2008; Lucas, Escudero et al. 2009). Para comprobar la función de pol μ en NHEJ, nos propusimos el estudio de cómo la radiación γ afecta a la formación de DSBs y aberraciones cromosómicas en células deficientes en pol μ , tanto humanas como murinas.

Sensibilidad a radiación γ en el sistema linfohematopoyético.

a) Las células Ramos que expresan un dominante negativo de pol μ muestran hipersensibilidad a la radiación ionizante.

Antes de avanzar hacia el estudio con muestras animales, empezamos por estudiar la posible influencia de la polimerasa sobre la estabilidad cromosómica en la línea celular Ramos (derivada de un linfoma de Burkitt humano), transducida con un vector retroviral de sobreexpresión de un dominante negativo de la DNA polimerasa μ (Ramos-DN) o con el vector vacío (Ramos-EV). Analizamos la estabilidad cromosómica de los cultivos irradiados (5 Gy), en comparación con la condición basal, mediante FISH (FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*) con sondas teloméricas para la correcta identificación de las aberraciones estructurales (figura 1). Las Ramos-DN sin tratamiento de irradiación mostraron un incremento de 0,8 veces ($p=0,0005$) en el número de roturas respecto al control (Ramos-EV). 24 horas después del tratamiento de irradiación, el incremento con respecto al control fue de 1,1 veces ($p=0,0287$) en fusiones (dicéntricos y fusiones robertsonianas) y radiales, y de 0.3 veces (ns) en el número de roturas. Podemos observar que, tras la irradiación, la diferencia en el nivel de roturas entre las Ramos-DN y las Ramos-EV disminuye considerablemente. La explicación podría encontrarse en que NHEJ no es totalmente eficaz en las Ramos-DN: las células Ramos experimentan más de 2 divisiones celulares durante las 24 horas posteriores a la irradiación, y parte de las roturas cromosómicas que no pueden ser reparadas dan lugar a la aparición de fusiones y radiales al completar el ciclo celular. Concluimos que la deficiencia en pol μ promueve, al menos *in vitro*, incremento de inestabilidad cromosómica.

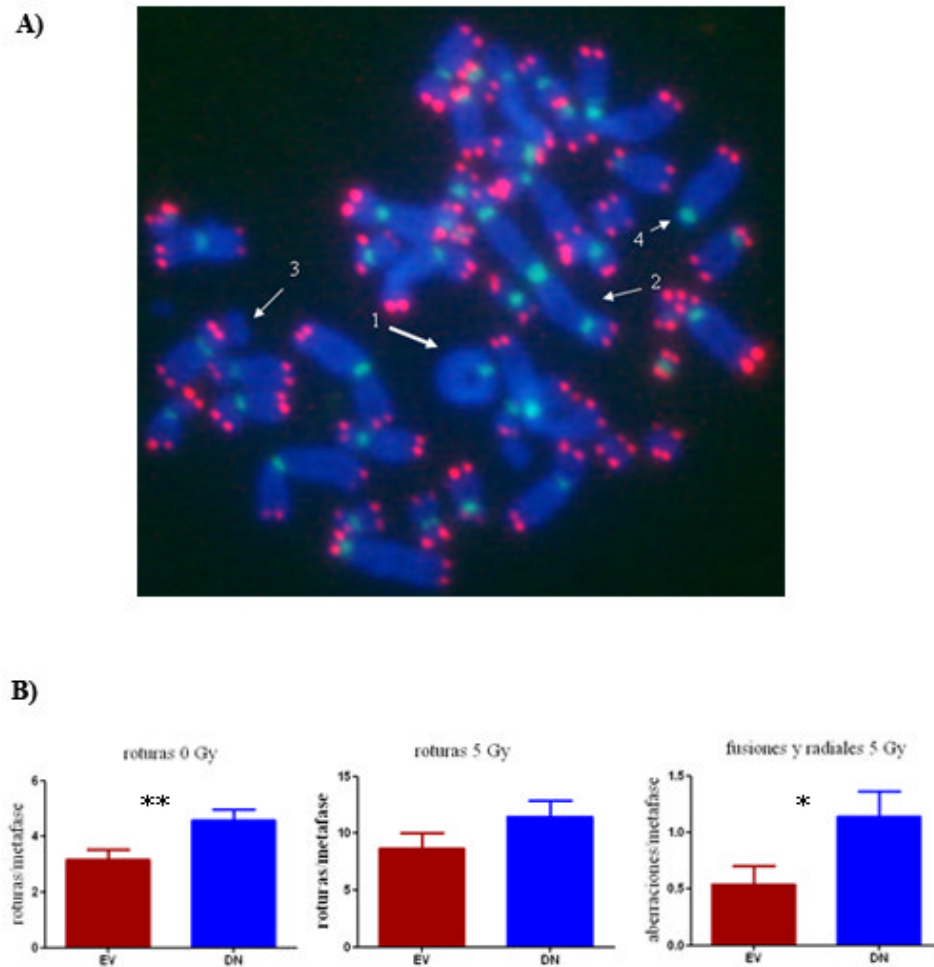


Figura 1. Análisis citogenético en células Ramos deficientes en pol μ . **A)** FISH telomérico, donde la señal verde procede de la sonda telomérica (FITC) y el DAPI tiñe de azul el cromosoma. Las flechas señalan distintas aberraciones cromosómicas (ver materiales y métodos) (1: anillo; 2: cromosoma tricéntrico; 3 y 4: rotura cromosómica). **B)** Análisis estadístico de los datos de inestabilidad cromosómica. A la izquierda, se representan las roturas por metafase en las células sin irradiar (0 Gy) ($n=56$ metafases en las Ramos-DN; $n=54$ en las Ramos-EV). Los dos gráficos siguientes muestran las aberraciones cromosómicas 24 horas postirradiación (5 Gy) ($n=37$ metafases en las Ramos-DN; $n=36$ en las Ramos-EV); en el gráfico central, se representan las roturas y, en el de la derecha, el conjunto de fusiones (ver materiales y métodos) y radiales.

b) Las células primarias de médula ósea de los ratones $\mu^{-/-}$ muestran inestabilidad cromosómica tras radiación ionizante.

Con objeto de avanzar hacia el sistema *in vivo*, decidimos estudiar el nivel de daño citogenético tras un tratamiento con radiación γ en médula ósea de los ratones *knockout* de μ ($\mu^{-/-}$) y de los correspondientes controles silvestres (wt).

En un primer estudio, extrajimos médula ósea y la pusimos en cultivo durante 48 h, período tras el cual fue sometida a una dosis de 4 Gy. 24 horas después de la irradiación, analizamos la estabilidad cromosómica mediante dos técnicas de hibridación fluorescente *in situ*: FISH telomérico y *painting* cromosómico (fig.2). La sonda empleada en esta última técnica está dirigida contra el cromosoma 6, que alberga el conjunto de genes que codifican la región variable de las inmunoglobulinas. Ambas técnicas demostraron una mayor tasa de aberraciones en las células de médula ósea $\mu^{-/-}$ tras la irradiación, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre las células wt y $\mu^{-/-}$ en condiciones basales.

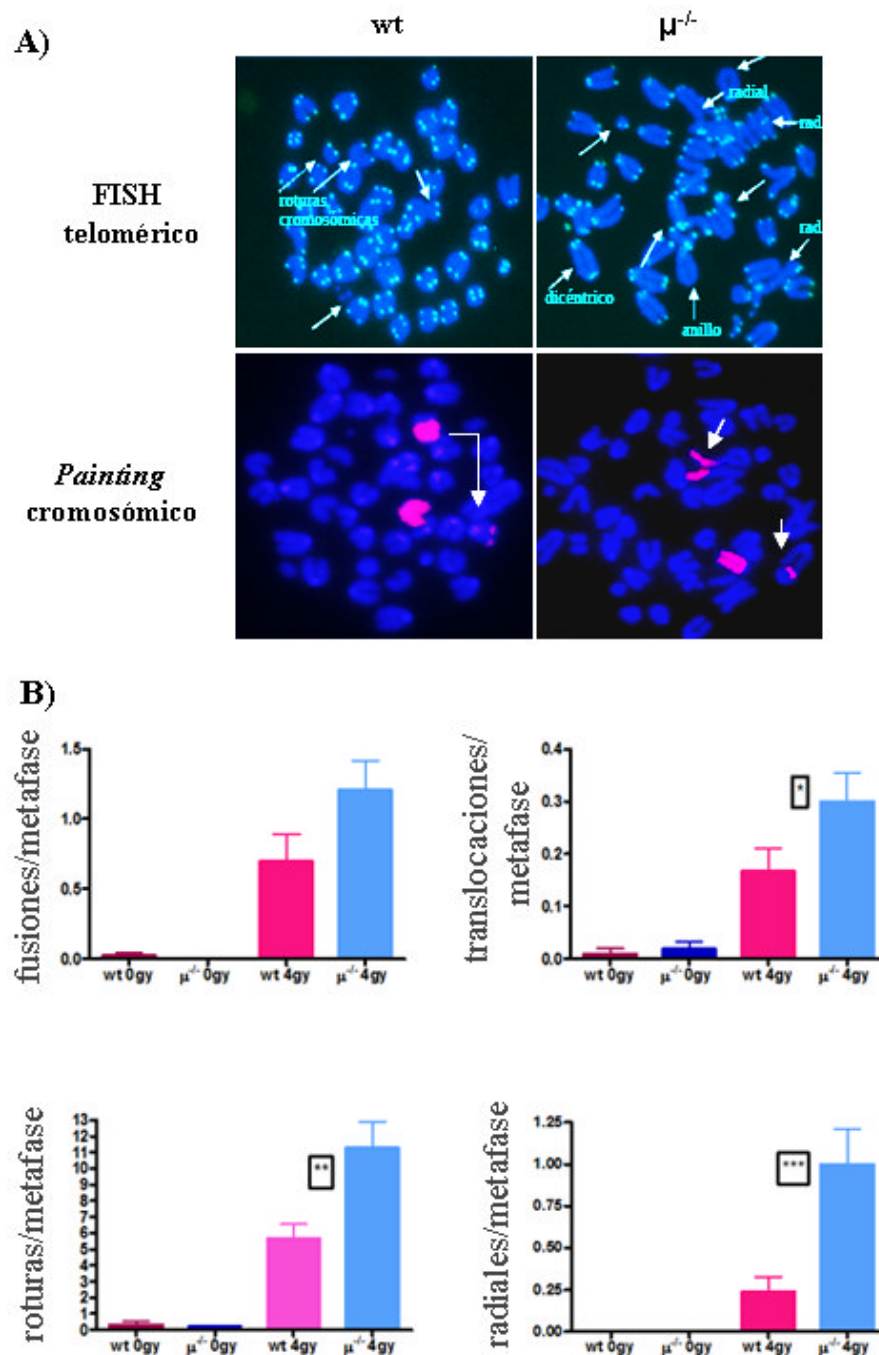


Figura 2. Estabilidad cromosómica en células de ratones wt y $\mu^{-/-}$ en condiciones basales y tras radiación γ (4 Gy). A) Imágenes representativas de aberraciones cromosómicas tras irradiación. Arriba, FISH telomérico, donde la señal verde procede de una sonda telomérica (FITC) y el DAPI tiñe de azul todo el cromosoma. Las flechas señalan distintas aberraciones cromosómicas. Abajo, *painting* cromosómico: la sonda específica del cromosoma 6 genera la señal roja y el DAPI, la señal azul. Las flechas señalan las translocaciones que afectan a dicho cromosoma. **B)** Análisis estadístico de los datos de estabilidad cromosómica obtenidos mediante las técnicas de FISH (A) (n=50 metafases; mezcla de médula ósea de 3 ratones en cada genotipo y condición).

En un segundo experimento, los ratones fueron sometidos a 5 Gy de irradiación γ y 6 horas después, cuando ya habían tenido tiempo para reparar el DNA, se sacrificaron y se prepararon los cultivos de médula, fijada 4 días después. Los resultados se compararon con ratones de genotipos equivalentes pero no sometidos a radiación. De nuevo, observamos que la deficiencia en μ conlleva un déficit en la reparación (tabla 1). Tras la irradiación, el número total de aberraciones se incrementa hasta 3 veces en el genotipo $\mu^{-/-}$. Las roturas cromosómicas aumentan 2,7 veces ($p=0,0014$); las configuraciones radiales, 4,8 veces ($p=0,05$); y el número de fusiones (dicéntricas y fusiones robertsonianas), 3,5 veces ($p=0,0003$).

genotipo	metafases analizadas	nº fusiones robertsonianas	nº dicéntricos	nº radiales	nº roturas	aberraciones/metafase
wt	64	6	37	2	188	3,6
$\mu^{-/-}$	65	6	169	10	531	11,0

Tabla 1. Análisis estadístico de la estabilidad cromosómica (FISH) de ratones wt y $\mu^{-/-}$ tras un tratamiento de irradiación. Los valores de cada genotipo se corresponden con los obtenidos de médula ósea procedente de 3 ratones distintos, en células extraídas 6 horas después de haber irradiado a los animales y mantenidas en cultivo durante 4 días.

c) Las células de médula ósea y los linfocitos B primarios de los ratones $\mu^{-/-}$ muestran mayor nivel de roturas de DSBs tras un tratamiento de irradiación.

Tanto las roturas cromosómicas como el resto de las aberraciones citadas se originan inicialmente a partir de una o varias DSBs (revisado en (Pfeiffer, Goedecke et al. 2000)). Cuando se forma una DSB en el DNA, la histona H₂AX es fosforilada por ATM para formar γ H₂AX a lo largo de varias megabases del DNA adyacente a la rotura (Rogakou, Boon et al. 1999). Como resultado de dicha fosforilación, se forma un foco de daño (en el que también se incluyen otras proteínas como 53BP1), que constituye la plataforma sobre la que se reclutan los factores de reparación. Por ello, γ H₂AX ha sido ampliamente empleado como marcador de DSBs (Pilch, Sedelnikova et al. 2003).

Analizamos los niveles de γ H₂AX en médula ósea y linfocitos B. Tres aproximaciones nos llevaron a confirmar una reparación deficiente en las células $\mu^{-/-}$:

1) En un primer estudio, analizamos los niveles basales de γ H₂AX en cultivos de médula ósea y linfocitos B de bazo (figura 3a). Para ello, empleamos un anticuerpo contra γ H₂AX marcado directamente con Cy3 (rojo) y contrateñimos las células con DAPI. Las células de médula ósea $\mu^{-/-}$ mostraron un nivel de DSBs 3,8 veces superior ($p<0,05$) con respecto a las wt. En el caso de los linfocitos B, no hemos encontrado diferencias significativas entre las células wt y $\mu^{-/-}$.

2) En una segunda aproximación, irradiamos animales wt y $\mu^{-/-}$ y analizamos los niveles de γ H₂AX 1 hora después de la irradiación (5 Gy). Las células $\mu^{-/-}$ mostraron un nivel significativamente superior de número de focos de γ H₂AX por célula (4,8 veces para los esplenocitos y 1,7 veces para las células de médula ósea; $p<0,001$) (figura 3b). Además, el número de células positivas para γ H₂AX resultó ser significativamente superior en la médula ósea $\mu^{-/-}$ (95% ($\mu^{-/-}$) frente a 27% (wt) de células positivas; $p<0,001$) (figura 3c). Sin embargo, el 91% de las células de médula ósea eran positivas para γ H₂AX en ambos genotipos, lo que sugiere que la médula ósea es más sensible a la irradiación γ que los

esplenocitos, probablemente debido a una sensibilidad diferencial entre los dos tipos celulares.

3) Los niveles de DSBs se analizaron también mediante *Western Blot* (figura 3d). Los cultivos de células B procedentes de bazo wt y $\mu^{-/-}$ fueron irradiados con 8 Gy y se recogieron 1, 3 y 6 horas después de la irradiación. Los niveles de $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ no son detectables en las células no irradiadas. Sin embargo, tras la irradiación, se observan diferencias entre genotipos: el nivel de $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ es 8-10 veces superior en los linfocitos B $\mu^{-/-}$, en los que los niveles basales de la histona fosforilada tardan más en recuperarse.

Sensibilidad a radiación γ en el sistemas no hematopoyéticos.

Para el estudio del efecto de la radiación γ en células $\mu^{-/-}$ no hematopoyéticas, realizamos una primera aproximación *in vitro*, mediante el estudio de la estabilidad cromosómica en fibroblastos embrionarios murinos (MEFs), que son células derivadas del tejido conjuntivo. En un segundo estudio, analizamos el efecto *in vivo*, midiendo los niveles de $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ en el hígado de ratones irradiados.

a) Los MEFs deficientes en pol μ son sensibles a la radiación ionizante.

En experimentos realizados anteriormente en el laboratorio, los MEFs $\mu^{-/-}$ mostraron que una supervivencia significativamente inferior que la de los wt tras ser irradiados (Lucas, Escudero et al. 2009). Considerando que tal efecto sería posiblemente debido a la incrementada acumulación de DSBs, decidimos analizar la estabilidad cromosómica en los MEFs primarios (tabla 2). Para ello, empleamos MEFs primarios (de pase 6), los irradiamos con 5 Gy, y fijamos las metafases 72 horas después. Los MEFs $\mu^{-/-}$ mostraron un mayor número de aberraciones por metafase tras ser sometidos a irradiación γ .

genotipo	metafases analizadas	nº fusiones robertsonianas	nº dicéntricos	nº radiales	nº roturas	aberraciones/ metafase
wt (0 Gy)	87	2	1	0	43	0,53
$\mu^{-/-}$ (0 Gy)	65	3	1	16	146	2,55
wt (5 Gy)	48	5	14	5	349	7,77
$\mu^{-/-}$ (5 Gy)	42	9	35	10	406	10,95

Tabla 2. Análisis estadístico de la estabilidad cromosómica mediante FISH en MEFs wt y $\mu^{-/-}$ primarios, en condiciones basales y tras un tratamiento de irradiación. Se representan los valores obtenidos de una mezcla de MEFs (en pase 6) procedentes de 3 embriones por genotipo, en las condiciones habituales de cultivo y 72 horas después de la inducción de daño con 5 Gy de irradiación γ (en comparación con las células no irradiadas (0 Gy).

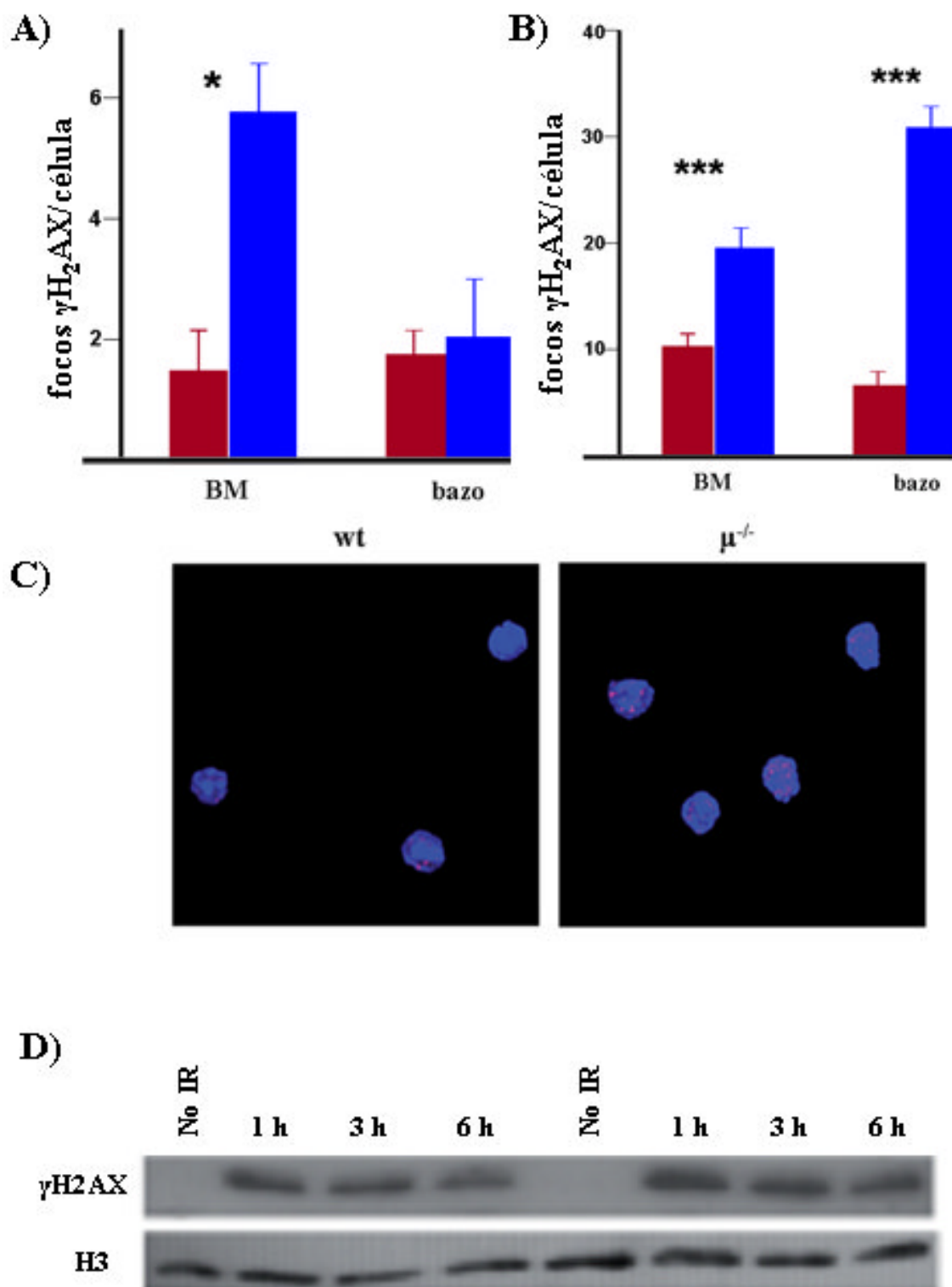


Figura 3. Expresión de $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ en y bazo de ratones $\mu^{-/-}$ en comparación con ratones wt. **A)** Número de focos de por célula (inmunocitoquímica) en cultivos de médula ósea y linfocitos B de bazo. **B)** Número de focos de por célula de $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ (inmunocitoquímica) en cultivos de médula ósea y esplenocitos de ratones irradiados (5 Gy). Las células se fijaron 1 hora después de la irradiación de los animales. **C)** Imagen representativa de los niveles de en $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ (rojo, Cy3) en células nucleadas de médula ósea (azul, DAPI) de ratones irradiados (3B). Las imágenes se obtuvieron con microscopio confocal. **D)** Western Blot para $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ en linfocitos B (mezcla de 3 bazos por condición y genotipo) recogidos 1, 3 y 6 horas tras la irradiación (8 Gy), en comparación con los niveles basales.

b) La hipersensibilidad a radiación γ también es apreciable en el hígado de los ratones $\mu^{-/-}$.

Analizamos la expresión de γ H2AX en el hígado de ratones wt y $\mu^{-/-}$, tanto en condiciones basales como tras haber irradiado al animal (fig. 4) (los mismos ratones empleados para el estudio en la tabla 1). Se observa que la expresión de este marcador es claramente superior en el hígado $\mu^{-/-}$ que en el wt tras la irradiación, no siendo detectable en las muestras sin irradiar.

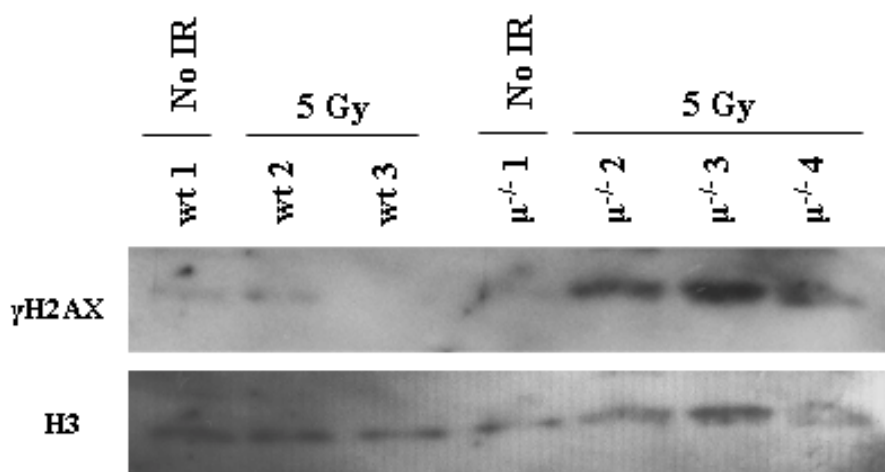


Figura 4. Análisis de la expresión de H2AX mediante *Western Blot* en hígado, en condiciones basales y 6 horas después de haber irradiado a los animales. Los gráficos muestran los niveles de expresión de γ H2AX (arriba) y de H3 (abajo), proteína empleada como control de carga. Cada extracto procede de un solo hígado, wt o $\mu^{-/-}$, según corresponda.

En conjunto, todos nuestros experimentos indican que la DNA polimerasa μ juega un papel importante en la reparación de DSBs inducidas por radiación γ en el sistema hematopoyético y en células/tejidos no hematopoyéticos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

2. SENSIBILIDAD DE LAS CÉLULAS DEFICIENTES EN POL μ A ESTRÉS OXIDATIVO.

Los MEFs constituyen un sistema celular muy bien caracterizado. Su comportamiento en cultivo, siguiendo un protocolo 3T3 (Todaro and Green 1963), consta de tres fases: 1) crecimiento exponencial, 2) senescencia y 3) immortalización. Se han descrito diversos mecanismos moleculares que contribuyen a la entrada en senescencia y a la immortalización de los MEFs en cultivo (revisado en (Sharpless and DePinho 2004; Ben-Porath and Weinberg 2005); (Irani, Xia et al. 1997; Sherr and DePinho 2000; Wright and Shay 2000; Campisi, Kim et al. 2001; Parrinello, Samper et al. 2003; Woo and Poon 2004)). La mayoría de ellos señala que, en el caso de los MEFs, la senescencia celular está relacionada con un incremento de estrés oxidativo (derivado del cultivo celular o inducción de oncogenes) y con el estado de reparación de DSB de la célula.

a) Los MEFs primarios pol $\mu^{-/-}$ entran prematuramente en senescencia.

Los MEFs deficientes en NHEJ ven reducida su capacidad proliferativa (Vogel, Lim et al. 1999; Espejel and Blasco 2002). Por tanto, decidimos estudiar el comportamiento en cultivo de los MEFs $\mu^{-/-}$.

Cultivamos los MEFs procedentes de los ratones wt y $\mu^{-/-}$ en las condiciones habituales ("normoxia": 5%CO₂, 20%O₂ y 95% de humedad relativa). Los MEFs deficientes en la polimerasa mostraron una proliferación reducida y una entrada prematura en senescencia (fig. 5).

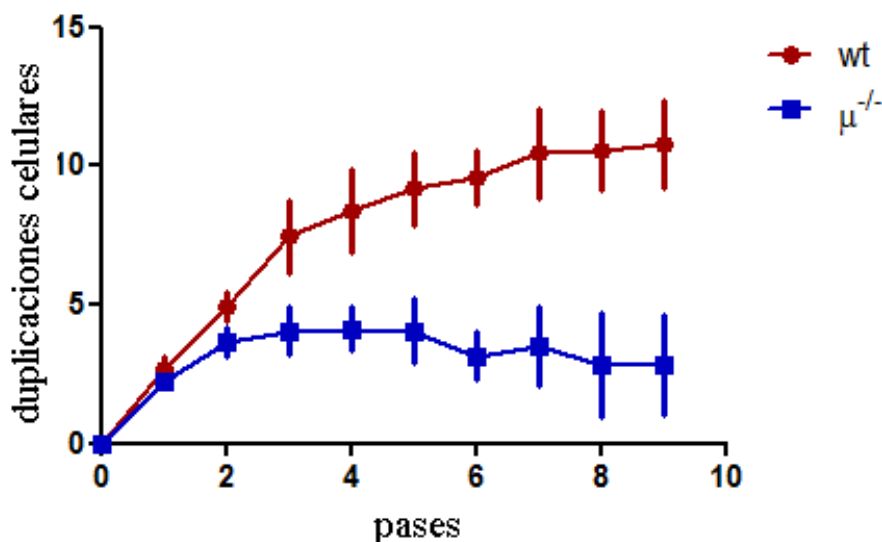


Figura 5. Ensayo 3T3 con MEFs wt y $\mu^{-/-}$. Cada punto representa el valor promedio de 3 experimentos, cada uno hecho con una mezcla de MEFs procedentes de tres embriones para cada genotipo.

Decidimos apoyar estos datos con un análisis de la expresión de marcadores directamente relacionados con el ciclo celular, la senescencia y la apoptosis mediante *Western Blot* (fig. 6). Analizamos las células en cultivo en el momento en el que más acusada era la diferencia de proliferación entre ambos genotipos (pases 6-9):

- P19 y P21 son dos reguladores de ciclo celular cuya sobreexpresión se induce en senescencia y en condiciones de estrés celular. Los niveles de P19 son más elevados en las células $\mu^{-/-}$ que en el wt (aproximadamente, 5 y 8 veces en pase 6 y 9, respectivamente). Los niveles de P21 también son superiores (aproximadamente el doble) en los MEFs $\mu^{-/-}$ a pase 9 (en pase 6, la diferencia aún no es apreciable).
- Los niveles de P16, cuya sobreexpresión también se induce en senescencia y en condiciones de estrés celular (comentado previamente, figura I8), no muestran diferencias significativas entre genotipos.
- BAX media apoptosis inducida por p53 (comentado previamente, pág. 28). Sus niveles de expresión son ligeramente superiores (1,5 veces) en pase 9 (sin diferencias en pase 6), pero las diferencias no son significativas.

Los datos sugieren que los defectos mostrados por los MEFs en cultivo correlacionan con un aumento notable de p19^{ARF} y en menor medida de p21, confirmando los datos anteriores de senescencia prematura.

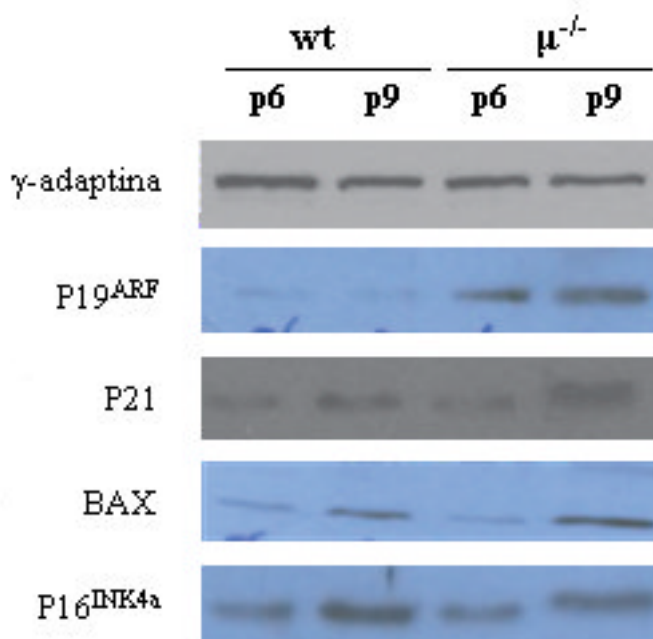


Figura 6. Análisis de expresión de marcadores relacionados con el ciclo celular mediante *Western Blot*. Cada muestra es un *pool* (n=3) de MEFs de pases 6 (p6) y 9 (p9).

b) Los MEFs primarios $\mu^{-/-}$ muestran mayor inestabilidad genética en cultivo.

Los defectos de proliferación que mostraban los MEFs deficientes en pol μ eran, probablemente, consecuencia del defecto en reparación previamente caracterizado en otros tipos celulares, al igual que ocurre en MEFs deficientes en los principales factores de NHEJ (Karanjawala, Grawunder et al. 1999). Por ello, analizamos la estabilidad cromosómica de los MEFs en pase 7 (cuando los $\mu^{-/-}$ ya están en senescencia) mediante FISH telomérico. Los resultados mostraron que los MEFs $\mu^{-/-}$ presentaban un incremento significativo en la proporción de aberraciones cromosómicas (15 veces superior) en comparación con los controles wt (fig.7).

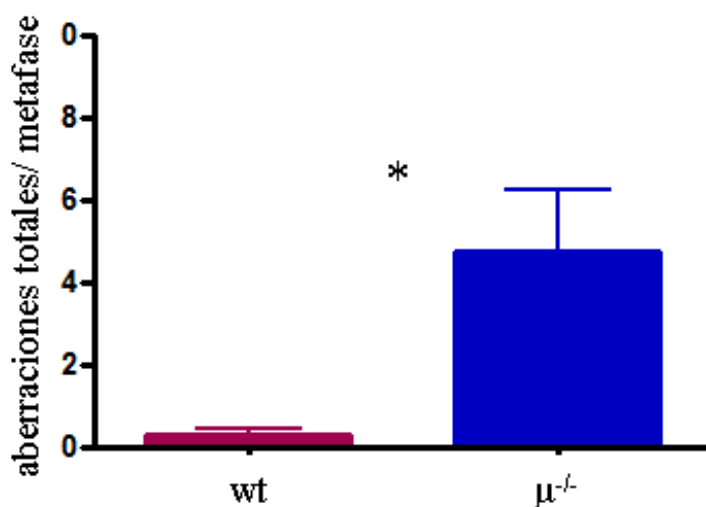


Figura 7. FISH telomérico en MEFs primarios wt y $\mu^{-/-}$. Se representa el nivel de aberraciones totales (roturas, fusiones y radiales) por metafase.

c) Los MEFs deficientes en pol μ son hipersensibles al estrés oxidativo: los defectos proliferativos y la inestabilidad genética de los MEFs $\mu^{-/-}$ se rescatan en una atmósfera reducida en oxígeno (5% O₂).

Para comprobar si el estrés oxidativo contribuía los defectos proliferativos de los MEFs deficientes en pol μ , cultivamos estas células de forma paralela en condiciones estándar (incubadores convencionales) y en una atmósfera con un 5% de oxígeno, similar a la fisiológica (Parrinello, Samper et al. 2003) (ver materiales y métodos). El fenotipo de los MEFs deficientes en pol μ se revirtió casi totalmente en estas últimas condiciones (fig.8). Además, ni los controles ni los $\mu^{-/-}$ entraron en senescencia cuando se cultivaron en una presión parcial de oxígeno reducida, lo que se puede observar tanto en las curvas de crecimiento (fig.8a) como en el tamaño celular determinado por citometría flujo (fig.8b), experimento que nos muestra una población de un tamaño celular superior (lo cual es una característica de las células senescentes (Bowman, Meek et al. 1975; Wagner, Horn et al. 2008) que sólo existe en los MEFs $\mu^{-/-}$ cultivados en un 20% de O₂.

Como segundo experimento, analizamos la estabilidad cromosómica de MEFs procedentes de los ensayos de immortalización en un momento de comportamiento acusadamente divergente entre ambos genotipos en condiciones de *normoxia* (pase 8), y pudimos comprobar que el fenotipo de inestabilidad de los MEFs deficientes en pol μ se rescata cuando la presión parcial de oxígeno es similar a la fisiológica (fig.9).

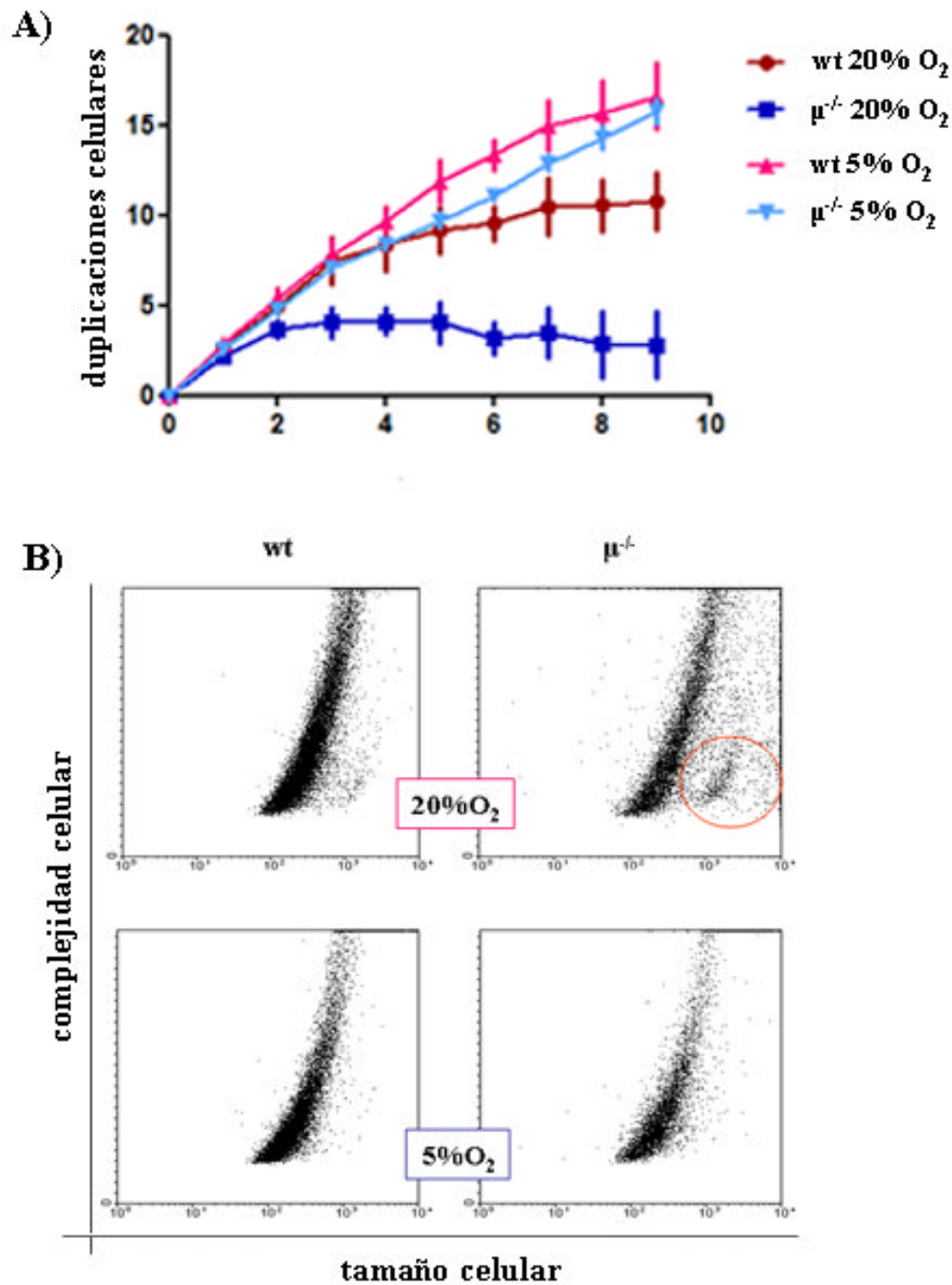


Figura 8. Estudio de la proliferación de MEFs en diferentes presiones de oxígeno (5% O₂ y 20% O₂). **A)** Ensayo 3T3 en MEFs primarios procedentes de ratones wt y μ^{-/-} cultivados en atmósferas con distintas presiones de oxígeno (5% y 20%). Cada punto representa el valor promedio de 3 experimentos, cada uno hecho con un pool de MEFs procedentes de 3 embriones para cada genotipo. **B)** Análisis citométrico de MEFs en fase 7. Se representa la complejidad (eje de ordenadas) frente al tamaño celular (eje de abscisas) en unidades arbitrarias; mostrando un aumento en el tamaño de los MEFs μ^{-/-} cultivados al 20% O₂ (población rodeada con un círculo rojo).

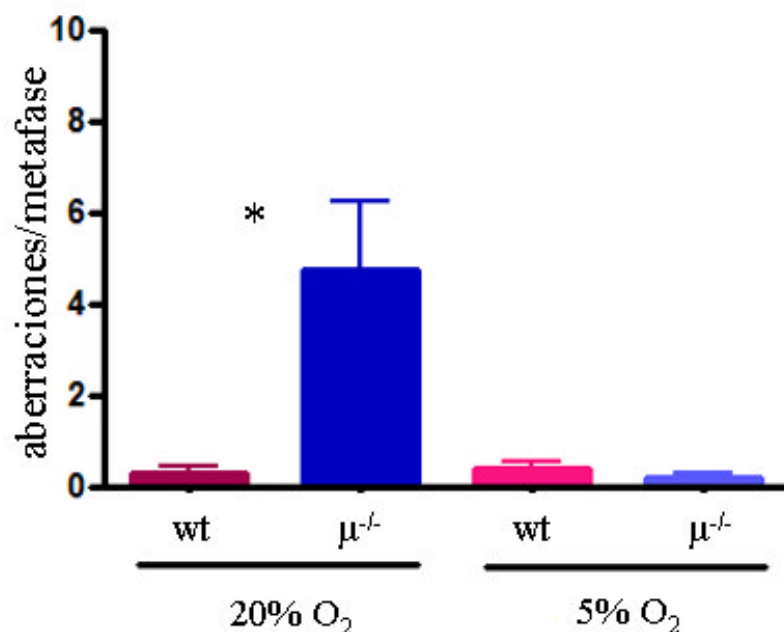


Figura 9. FISH telomérico en MEFs wt y $\mu^{-/-}$ en fase 7, cultivados en atmósferas con distintas presiones de oxígeno (5% O₂ y 20% O₂). Se representa el valor promedio (3 experimentos) las aberraciones totales por metafase en cada condición y genotipo (mezcla de células procedente de tres embriones).

d) Los MEFs primarios deficientes en pol μ presentan un mayor nivel de peróxidos, además de un incremento en el contenido mitocondrial.

Empleamos MEFs wt y $\mu^{-/-}$ en fase 7, en las dos condiciones de presión de oxígeno, para determinar, mediante FACS, el contenido en radicales libres y el contenido y potencial de membrana mitocondriales (figura 10). 1) Con DCFDA (5 (6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihidrofluorescein diacetate acetyl ester), compuesto fluorescente que indica la cantidad relativa de peróxidos, pudimos estimar el nivel celular de los mismos. 2) El MTG (*Mitotraker Green*) se une covalentemente a la membrana interna de la mitocondria independientemente de su potencial, lo que nos permite estimar el contenido mitocondrial de la célula (Pendergrass, Wolf et al. 2004). 3) El TMRM (*tetramethylrhodamine*) se une a la membrana mitocondrial de forma dependiente del potencial de la misma, por lo que una variación en la señal de este reactivo indica una alteración en la polaridad de dicha membrana, siempre y cuando se use a bajas concentraciones (Bouevitch, Lewis et al. 1993).

En un 20% de O₂, los MEFs $\mu^{-/-}$ presentan mayores niveles de DCFDA y MTG, lo que se traduce en un mayor nivel de peróxidos y un incremento en el contenido mitocondrial. La diferencia entre genotipos en los niveles de DCFDA se reduce en un 5% O₂, lo que podría sugerir que el estrés oxidativo provocado por una presión de O₂ elevada causa disfunción mitocondrial en los MEFs $\mu^{-/-}$. Los niveles de MTG, y, por tanto, el contenido mitocondrial, se reducen en la atmósfera con bajo contenido en O₂ y, además, se anulan las diferencias entre wt y $\mu^{-/-}$ presentes en *normoxia* (fig.10). Ello puede deberse a que los MEFs $\mu^{-/-}$ tienen un mayor contenido mitocondrial (como consecuencia del mayor tamaño

celular indicado en la citometría de flujo (fig. 8b)). Una explicación alternativa podría ser que una presión mayor de oxígeno (20%) conlleve una sobreactivación de la biogénesis mitocondrial para compensar en defecto bioenergético provocado por el estrés oxidativo en los MEFs $\mu^{-/-}$, hipótesis apoyada por los datos de DCFDA. El TMRM muestra una señal inferior (mayor despolarización de la membrana mitocondrial) en los MEFs $\mu^{-/-}$ respecto a los wt en ambas presiones de oxígeno, y, a su vez, los niveles son inferiores en una presión de oxígeno reducida. Una posibilidad que explicaría una polarización ligeramente inferior de la membrana en los MEFs $\mu^{-/-}$ es que la tasa de apoptosis esté incrementada. En consecuencia, analizamos el ciclo celular de los MEFs mediante tinción con ioduro de propidio para tener una aproximación más directa al estudio de la apoptosis en estas células. No observamos diferencias significativas (datos no mostrados), lo cual sugiere que el defecto generado por la deficiencia de pol μ en los MEFs en condiciones de estrés oxidativo es suficiente para inducir la entrada en senescencia, pero no para llevar a las células apoptosis.

El conjunto de los datos sugiere que la deficiencia en pol μ provoca en los MEFs una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo. Esto genera, como consecuencia de un mecanismo de NHEJ menos eficiente, un incremento de aberraciones cromosómicas que lleva a los MEFs a entrar prematuramente en senescencia.

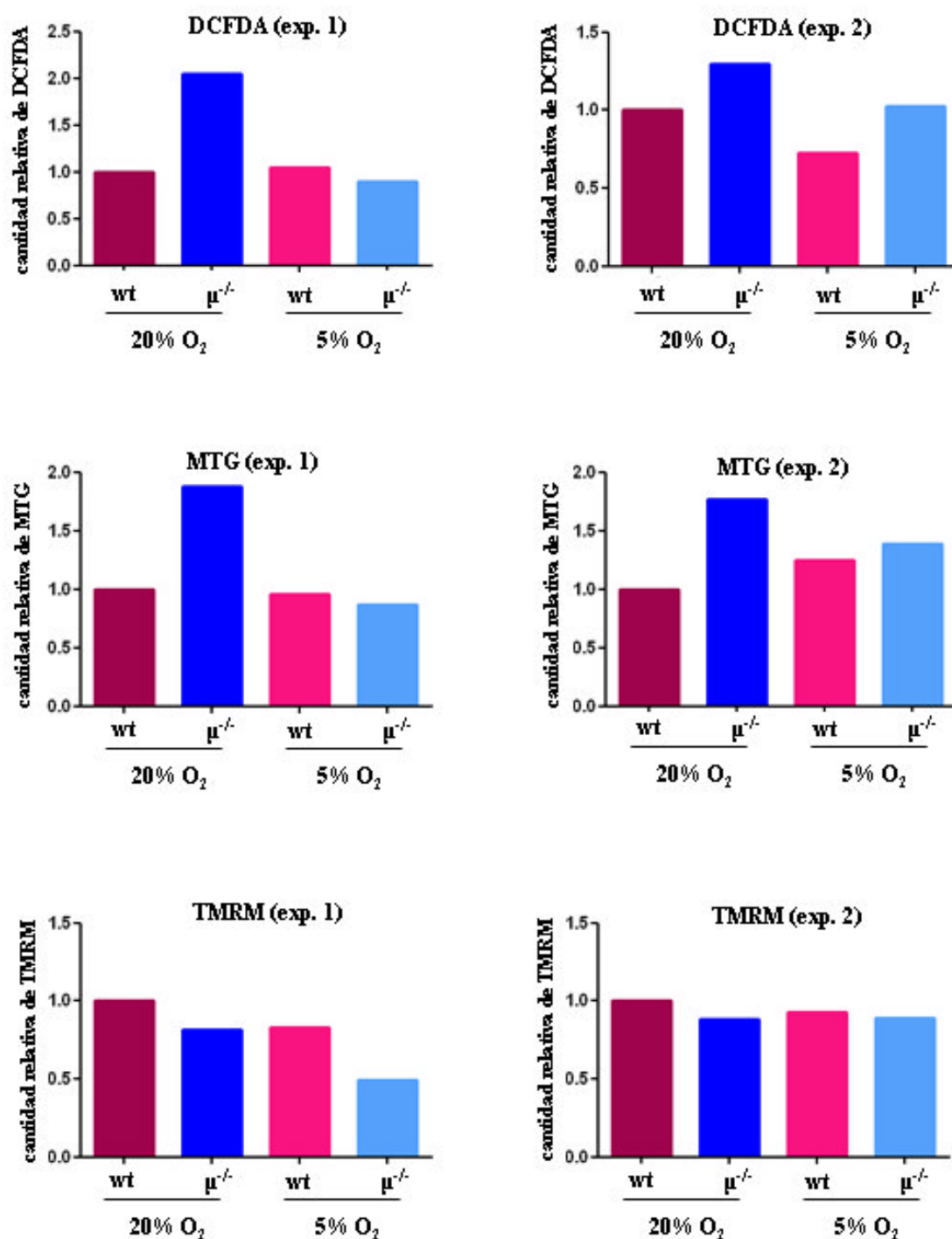


Figura 10. Análisis de ROS mediante citometría de flujo en MEFs (p7) cultivados en distintas presiones de oxígeno (5% O₂ y 20% O₂). Niveles celulares de DCFDA, MTG Y TMRM en cada genotipo (mezcla de MEFs procedente de 3 embriones) y condición de presión parcial de oxígeno. Se representa los valores obtenidos en experimentos individuales, pues la magnitud de los niveles obtenidos (unidades arbitrarias) varían considerablemente entre ellos. Todos los datos han sido normalizados respecto a los obtenidos con las células wt cultivadas en 20% O₂. Los valores de TMRM se han normalizado, además, respecto a los de MTG.

B. Efecto de la deficiencia en pol μ en la reparación por recombinación homóloga.

El entrecruzamiento entre cromátidas hermanas (SCE, del inglés, *Sister Chromatid Exchange*) es un producto de la reparación por HR, cuando ésta no ha transcurrido de manera perfecta (por ejemplo, por mutaciones en la hebra molde). El nivel de SCE es ampliamente usado como marcador de la actividad de HR (revisado en (Wilson and Thompson 2007)), lo que nos llevó a estudiar estos entrecruzamientos en distintos sistemas celulares deficientes en pol μ para ver si la ausencia de esta proteína tiene algún tipo de impacto en la recombinación homóloga.

Para detectar los entrecruzamientos entre cromátidas hermanas, hacemos uso de bromodeoxiuridina (BrdU). Este compuesto es análogo a la timidina, por lo que, adicionado al medio de cultivo en exceso, la célula lo incorpora como nucleótido en lugar de esta última. Como trata de explicarse en el siguiente diagrama (figura 11), tras dos duplicaciones celulares, cabría esperar que una de las cromátidas hermanas hubiese incorporado BrdU en lugar de timidina, mientras que la cromátida hermana sólo contendría timidina. Por tanto, al hibridar las metafases con un anticuerpo contra BrdU marcado con FITC, observaríamos una cromátida verde y la otra, por contratinción con DAPI, en azul.

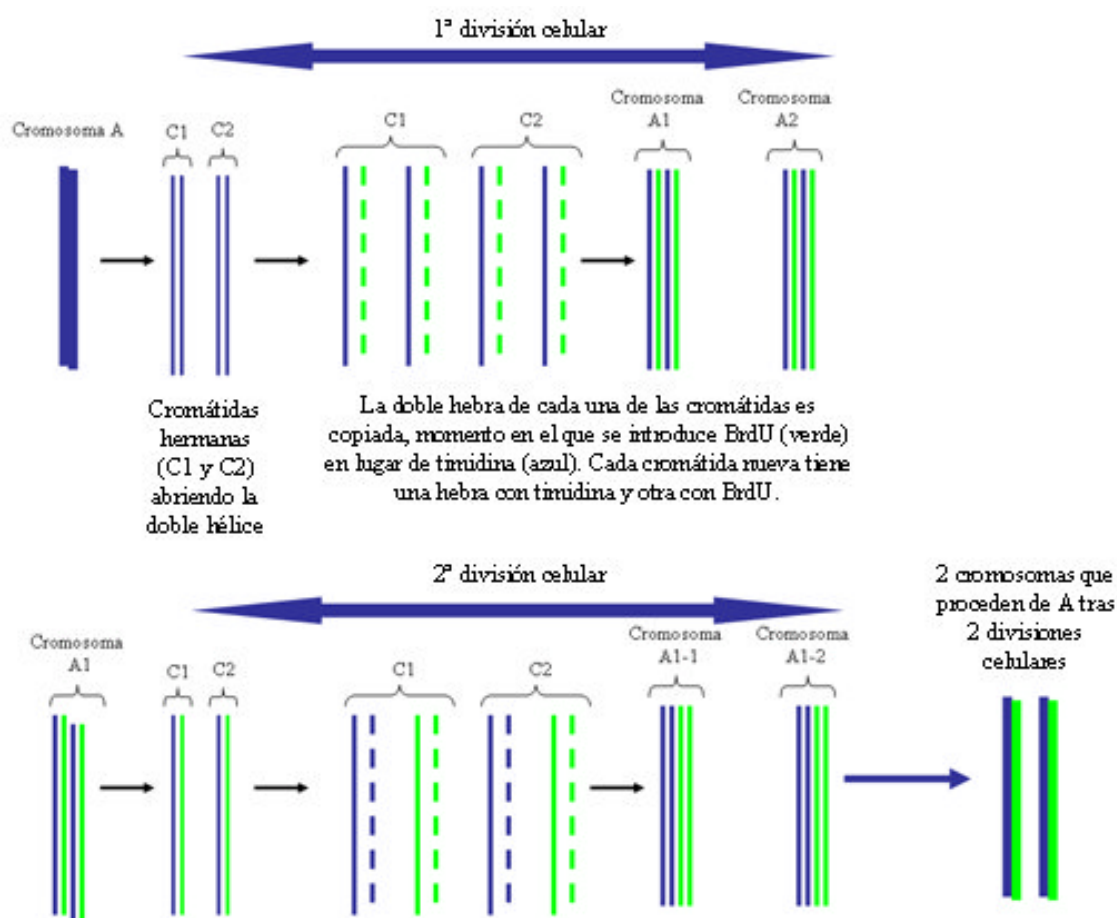


Figura 11. Esquema del mecanismo de incorporación de BrdU durante la duplicación celular.

Sin embargo, si el proceso de HR hubiese producido entrecruzamientos, observaríamos un cambio en el patrón de distribución de BrdU: ambas cromátidas contendrían fracciones verdes (BrdU) y azules (timidina) (figura 12a).

1. SCE EN LÍNEAS CELULARES.

La tasa de SCE se ve incrementada en las células Ramos y CHO que expresan el dominante negativo de pol μ .

Comenzamos por el análisis de SCE en la línea celular humana Ramos (fig. 12b), en la que la sobreexpresión del dominante negativo de pol μ dio lugar a un incremento significativo en la tasa de SCE. Las Ramos-DN presentan un 47% más de entrecruzamientos por cromosoma que las células Ramos-EV (valor medio DN= $0,2845 \pm 0,01944$; valor medio EV= $0,1932 \pm 0,01982$; $p=0,0031$).

Para dar más peso a los resultados, utilizamos una segunda línea celular, esta vez procedente de *hamster*: CHO (*Chinese Hamster Ovary*) (fig. 12c). De nuevo, la sobreexpresión del dominante negativo de pol μ conllevó una elevación significativa de los niveles de SCE. Las células CHO-DN presentan un 28,37% más de entrecruzamientos por cromosoma que las CHO-EV (valor medio DN= $1,068 \pm 0,03466$; valor medio EV= $0,832 \pm 0,03122$; $p<0,0001$).

Los datos indican que la deficiencia de pol μ induce una activación de HR por encima de los niveles basales en células Ramos y CHO.

2. SCE EN CÉLULAS PRIMARIAS.

La deficiencia en pol μ provoca un incremento en tasa de SCE en MEFs, pero no en los linfocitos B primarios.

Nuestro siguiente modelo para el estudio de SCE lo constituyen los MEFs primarios (fig. 12d), en los que volvimos a observar que la ausencia de pol μ provoca un incremento del número de entrecruzamientos por cromosoma: los MEFs $\mu^{-/-}$ muestran un 29% más de SCE por cromosoma que los wt (valor medio $\mu^{-/-}$: $0,5771$; valor medio wt: $0,4471$; $p=0,0315$).

El siguiente paso fue comprobarlo en células del sistema linfohematopoyético, y lo hicimos en linfocitos B purificados de bazo (fig. 12e). En contra de la trayectoria que hasta el momento marcaban los resultados, no encontramos diferencias en la tasa de SCE en función del genotipo (wt o $\mu^{-/-}$). Esto puede ser debido a que la producción de SCE es dependiente de tipo celular. Una segunda alternativa es que las líneas celulares Ramos y CHO y los MEFs están durante un cierto periodo de tiempo en cultivo antes de iniciar el ensayo (lo cual no ocurre con los linfocitos), lo que supone que estas células están más estresadas y, por tanto, habrá más roturas que reparar mediante HR, lo cual se deriva en una mayor probabilidad de detectar errores en esta vía de reparación.

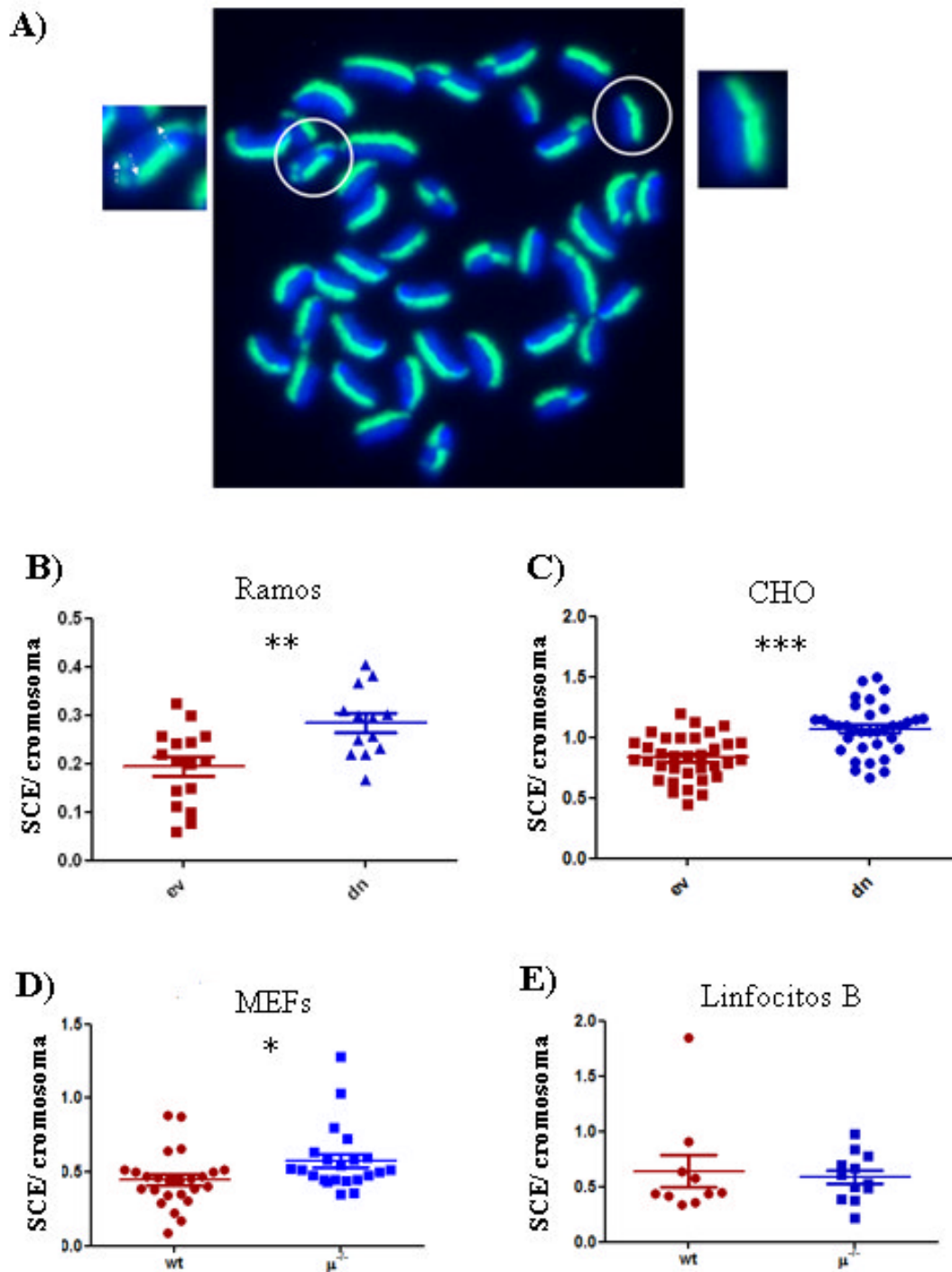


Figura 12. Análisis de Sister Chromatid Exchange. A) Representación ilustrativa de la técnica. A la derecha, un cromosoma sin entrecruzamientos: una cromátida teñida en verde (señal que indica la incorporación de BrdU) y otra en azul (DAPI). A la izquierda, un cromosoma con 3 entrecruzamientos (indicados con flechas), donde el azul y el verde se combinan en la misma cromátida. **B-E)** Análisis de SCE en diferentes sistemas celulares: B) Ramos, C) CHO, D) MEFs (mezcla de 3 embriones por genotipo) en pase 6 y E) linfocitos B (mezcla de 3 bazos por genotipo) purificados de bazos procedentes de animales de 2,5 meses de edad.

El conjunto de los experimentos sugiere que la deficiencia de pol μ provoca, de manera dependiente de tipo celular y/o cantidad de daño, una sobreactivación de HR como respuesta de la célula en compensación a un mecanismo de NHEJ menos eficiente.

C. Estudio del envejecimiento en tejidos en ausencia de la DNA polimerasa μ .

Varios modelos murinos de deficiencia en la reparación de DNA (Ku, LigIV, DNA-PKcs, Xrcc1, Ercc1) muestran una reducción de la longevidad. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que los ratones $\mu^{-/-}$ viven aproximadamente un 25% más que los controles (fig.13), lo que indica que estos ratones tienen un envejecimiento retardado. Esta hipótesis está apoyada por características fenotípicas como un menor grosor de la piel y un retraso en el envejecimiento de la función cerebral (habilidad cognitiva y aprendizaje). En su conjunto, estos datos indican, sorprendentemente, que la ausencia una polimerasa reparadora de daño en el DNA pueda ser beneficiosa para la longevidad y la funcionalidad de determinados órganos y sistemas.

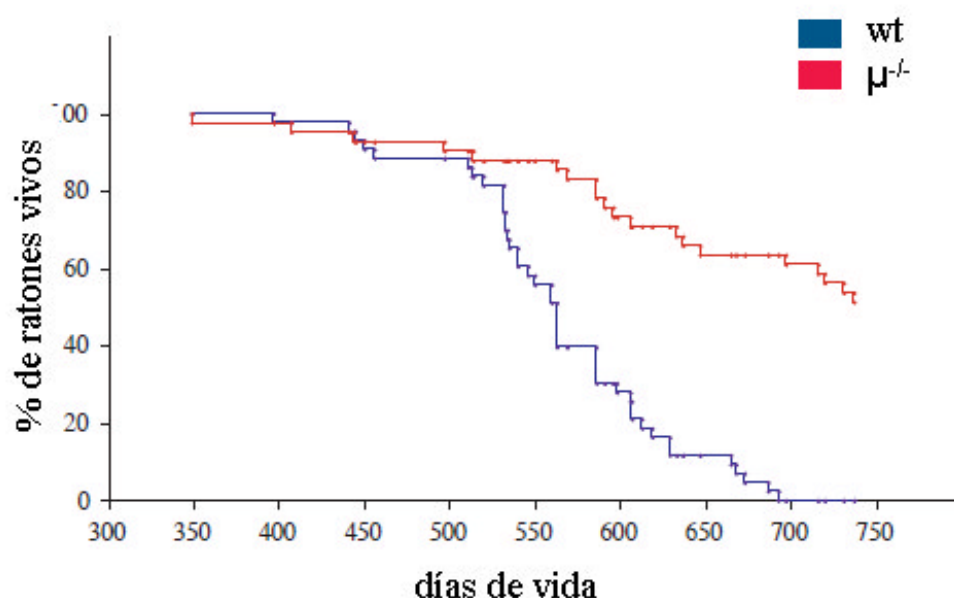


Figura 13. Supervivencia de los ratones wt y $\mu^{-/-}$. Los ratones $\mu^{-/-}$ muestran un incremento significativo en la longevidad (27%): la media de vida de los wt es de 550 días, frente a los 750 de los $\mu^{-/-}$.

1. ENVEJECIMIENTO EN EL HÍGADO DE RATONES $\mu^{-/-}$.

El hígado de los ratones $\mu^{-/-}$ viejos presenta menor grado de poliploidía y de activación de los procesos apoptóticos.

El hígado es un órgano esencial con funciones clave para el control del metabolismo. Debido a su importancia, se ha estudiado en detalle cómo afecta el envejecimiento al hígado en humanos y en modelos animales. Los organismos eucariotas contienen normalmente células diploides. Sin embargo, hay excepciones. Algunos tejidos, como el hígado, poseen un porcentaje de células poliploides. Durante el crecimiento, el

parénquima hepático experimenta cambios caracterizados por una poliploidización gradual como resultado de modificaciones en la división celular (revisado en (Celton-Morizur and Desdouets 2010)). El grado de poliploidía en los hepatocitos aumenta con la edad (revisado en (Storchova and Pellman 2004);(Funk-Keenan, Haire et al. 2008)), y está asociado a inestabilidad genética y/o deterioro funcional (revisado en (Storchova and Pellman 2004)).

Con objeto de averiguar cómo la ausencia de μ afecta a la estabilidad cromosómica en el hígado (órgano que no pertenece al sistema hematopoyético), analizamos el ciclo celular de hepatocitos procedentes de ratones viejos. En las células $\mu^{-/-}$, la tinción con yoduro de propidio (IP) reveló una disminución del porcentaje de células cuyo genoma es $8n$ o más (29% menor en el hígado $\mu^{-/-}$; $p < 0,05$), especialmente marcada en la proporción de células $8n$ (40%; $p = 0,028$) con respecto a las wt. Estos datos muestran una menor proporción de células poliploides (figura 14), lo que fortalece nuestra hipótesis de la función de μ en el envejecimiento.

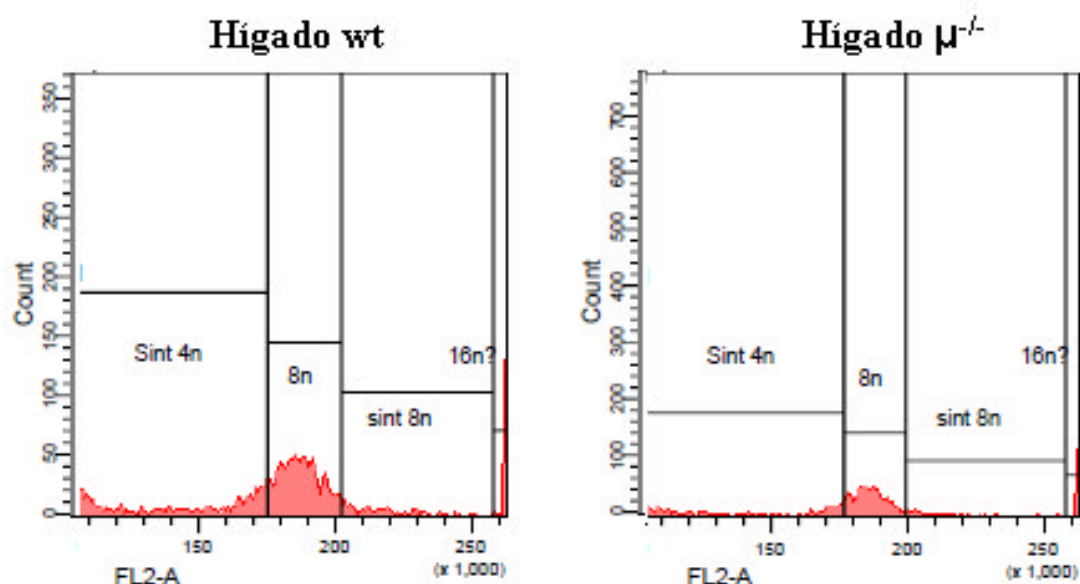


Figura 14. Imagen representativa del ciclo celular en hígado de ratones wt y $\mu^{-/-}$ viejos. Se representa el ciclo celular de células poliploides obtenido por tinción con IP.

En busca de un mecanismo molecular que contribuya al fenotipo de los ratones $\mu^{-/-}$ en hígado, realizamos arrays de expresión en hígados procedentes de animales de 14 meses de edad (4 animales de cada genotipo). Los resultados mostraron 1556 genes diferencialmente expresados, y el análisis mediante *Gene Ontology* (GO) muestra 49 procesos desregulados (tabla 3). Observamos 26 procesos regulados a la alta en el ratón deficiente en μ , de los cuales la mayoría está involucrada en el metabolismo de compuestos celulares (porfirina, grupo hemo, pigmentos, colesterol, aminas, etc.). De los 23 restantes, regulados a la baja, los más representados son los relacionados con el sistema renina-angiotensina y con la presentación y el procesamiento de antígenos. Actualmente, nos encontramos validando los diferentes procesos desregulados. Por el momento, podemos decir que los procesos inhibidos en este estudio no parecen contribuir al retraso en el envejecimiento del ratón $\mu^{-/-}$, ya que: 1) el análisis por RT-PCR de genes clave en el sistema renina-angiotensina, regulado a la alta en el envejecimiento fisiológico (revisado en (de Cavanagh, Flores et al. 2008)), no ha mostrado diferencias significativas

entre genotipos (datos no mostrados) y 2) los datos publicados acerca de la presentación y el procesamiento de antígenos apuntan mayoritariamente a que estos procesos disminuyen con el envejecimiento (Herrero, Marques et al. 2001; Herrero, Sebastian et al. 2002; McElhaney and Effros 2009; Xie, Mei et al. 2009).

Término GO	valor p
Procesos biológicos regulados a la baja en el hígado $\mu^{-/-}$	
metabolismo de porfirina	0,0000000
metabolismo de hemo	0,0000000
metabolismo de pigmentos	0,0007000
catabolismos de aminoácidos de la familia de la glutamina	0,0007000
metabolismo de aminoácidos	0,0015000
procesos celulares fisiológicos	0,0015000
metabolismo secundario	0,0016000
catabolismo de aminoácidos	0,0035000
metabolismo de lipoproteínas	0,0039000
regulación de absorción del colesterol	0,0045000
catabolismo de arginina	0,0045000
biosíntesis de heparan-sulfato proteoglicano	0,0045000
metabolismo de aminoácidos y derivados	0,0049000
metabolismo celular proteico	0,0060000
aminoacilación de tRNA para la traducción de proteínas	0,0068000
aminoacilación de tRNA	0,0068000
activación de aminoácidos	0,0068000
absorción de colesterol	0,0074000
digestión lipídica	0,0074000
regulación negativa de extensión de axones	0,0074000
regulación negativa de axogénesis	0,0074000
metabolismo de heparan-sulfato proteoglicano	0,0074000
metabolismo de aminas	0,0079000
catabolismo de aminas	0,0082000
catabolismo de compuestos nitrogenados	0,0082000
metabolismo de macromoléculas celulares	0,0088000
Procesos biológicos regulados a la baja en el hígado $\mu^{-/-}$	
presentación de antígeno	0,0002000
presentación de antígenos endógenos	0,0003000
metabolismo lipídico	0,0006000
presentación de antígenos peptídicos	0,0008000
regulación de la producción de aldosterona por el sistema renina-angiotensina	0,0012000
regulación del <i>output</i> renal mediada por angiotensina	0,0012000
respuesta renal al flujo sanguíneo durante la regulación del flujo sanguíneo por el sistema renina angiotensina	0,0012000
transporte electrónico	0,0012000
metabolismo de esteroides	0,0019000
generación de precursores metabólicos y energía	0,0023000
procesamiento de antígeno	0,0026000
transporte de Golgi	0,0033000
regulación de niveles de fluidos corporales por el sistema renina-angiotensina	0,0036000
metabolismo de lípidos celulares	0,0037000
procesamiento de antígenos endógenos vía MHC de clase I	0,0043000
regulación de fluidos corporales	0,0044000
localización	0,0065000
establecimiento de localización	0,0068000

sistema renina-angiotensina cerebral	0,0071000
regulación de la presión sanguínea mediante el volumen sanguíneo renal	0,0071000
procesamiento de antígenos exógenos vía MHC de clase II	0,0075000
procesos fisiológicos de reproducción del organismo	0,0094000
procesos fisiológicos de reproducción	0,0094000

Tabla 3. Análisis GO de la expresión diferencial de genes en hígado de ratones wt y $\mu^{-/-}$ viejos.
Procesos regulados a la alta y a la baja en el hígado $\mu^{-/-}$ respecto al wt.

La agrupación de genes por funciones celulares resultó en la observación de que genes inducibles por p53 y/o mediadores de apoptosis se encontraban regulados a la baja en las muestras $\mu^{-/-}$. En la tabla 4, se muestran los genes expresados diferencialmente de forma significativa ($p < 0,05$); ver materiales y métodos). Específicamente, encontramos 6 genes regulados a la baja con gran significancia estadística.

- 1) Bid (*BCL-2 Interacting Domain*), efector de apoptosis (Luo, Budihardjo et al. 1998; Desagher, Osen-Sand et al. 1999; Wei, Lindsten et al. 2000; Deng, Ren et al. 2003).
- 2) P21 (comentado previamente, figura I8).
- 3) Perp, efector de apoptosis mediada por p53 (Ihrie, Reczek et al. 2003), revisado en (Ihrie and Attardi 2004).
- 4) Acin1 (*Acinus; Apoptotic Chromatin Condensator*) es una diana de caspasas implicadas en los cambios nucleares que ocurren durante la apoptosis (Sahara, Aoto et al. 1999).
- 5) Egl3 (también llamado PDH3, *Prolyl Hydroxylase Domain protein 3*) es un inductor de apoptosis neuronal (Lipscomb, Sarmiere et al. 1999; Straub, Lipscomb et al. 2003; Lee, Nakamura et al. 2005); revisado en (Schlisio 2009)). Esta prolil-hidroxilasa es, al igual que los otros miembros de la familia (Egl1, Egl2), un sensor metabólico y de oxígeno (Kivirikko and Myllyharju 1998; Schofield and Zhang 1999; Bruick and McKnight 2001; Epstein, Gleadle et al. 2001; Ivan, Haberberger et al. 2002) que resulta esencial para la regulación del factor de transcripción HIF-1 (Epstein, Gleadle et al. 2001; Ivan, Haberberger et al. 2002).
- 6) Ddit4l (*DNA-Damage-Inducible Transcript 4-like*), también conocido como REDD2 (*DNA Damage Response 2*), es un gen descrito recientemente que media la muerte celular en monocitos humanos (Imen, Billiet et al. 2009). Su secuencia coincide en un 50% con la de REDD1, gen de respuesta a daño en el DNA y diana de p53 (Ellisen, Ramsayer et al. 2002), pero aún se desconoce si REDD2 es también una diana transcripcional de p53.

gen	Expresión en $\mu^{-/-}$ respecto al wt (2^M)	fdr
Bid	0,592	0,00032
p21	0,333	0,0086
Perp	0,654	0,00037
Egl3	0,064	0,00001
Acin1	0,663	0,00004
Ddit4l	0,463	0,00001

Tabla 4. Expresión diferencial de genes involucrados en apoptosis/inducibles por p53. Se representa la expresión relativa como 2^M , donde M es el valor de contraste, \log_2 de la variación (proporción) en la expresión entre dos condiciones experimentales (wt y $\mu^{-/-}$, en este caso) para un gen dado. Fdr es valor p ajustado para un test múltiple.

Quisimos validar estos genes, para lo que analizamos el nivel de transcritos (RNA mensajeros) mediante RT-PCR con sondas TaqMan. Como se puede observar en la figura 15, todos los genes han sido validados, puesto que los niveles de transcritos obtenidos mediante esta técnica son significativamente inferiores en el hígado $\mu^{-/-}$ con respecto al wt.

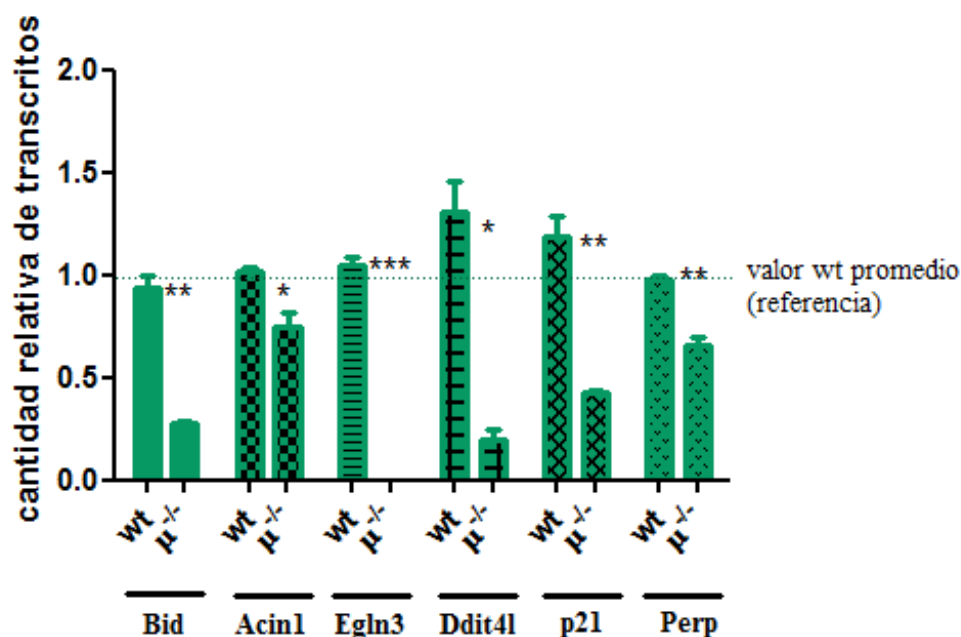
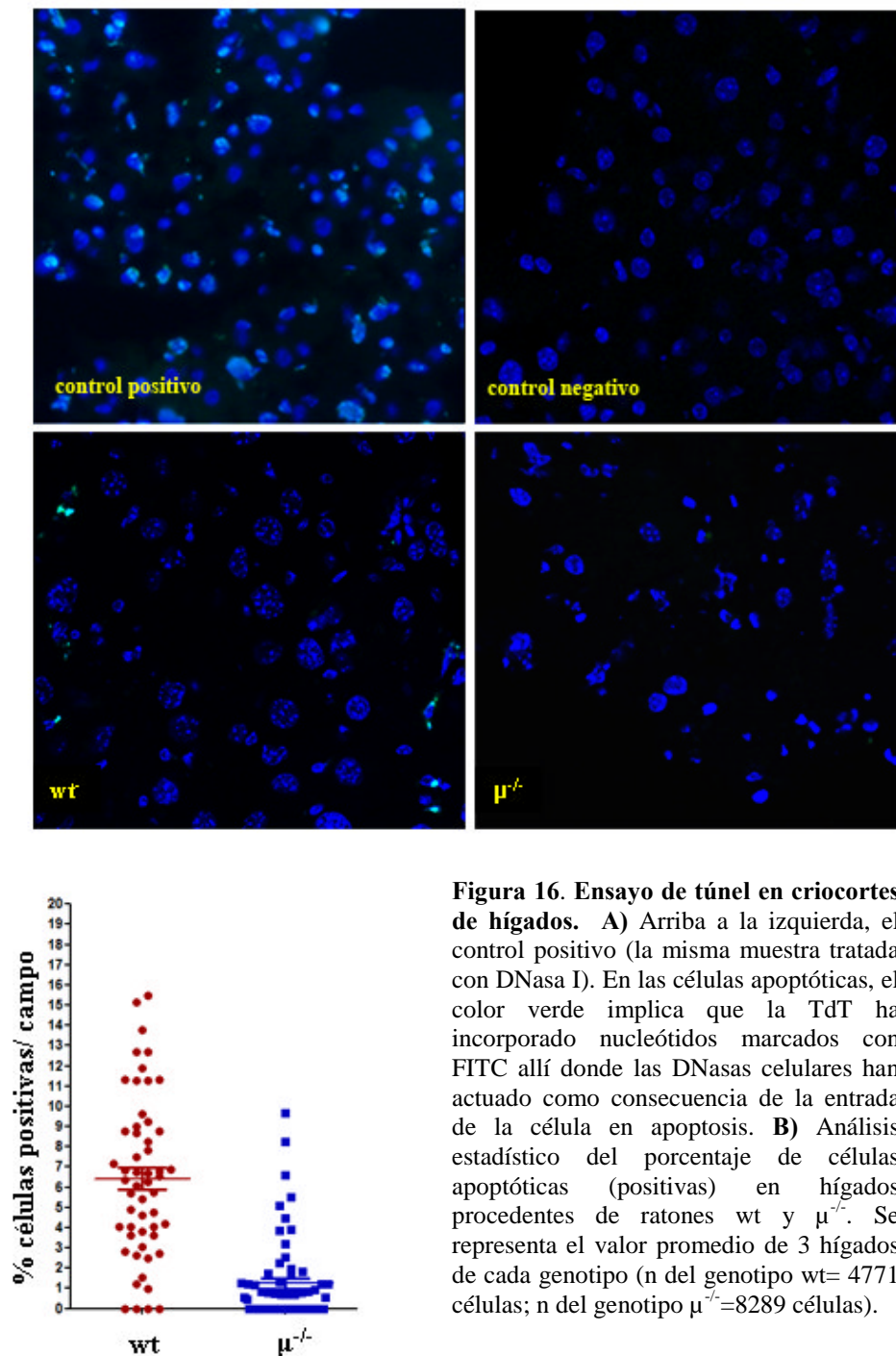


Figura 15. Expresión diferencial de la vía de p53/apoptosis. Validación de los datos de los *arrays*. Los niveles de mRNA se determinaron mediante TaqMan en hígados de 4 ratones de 14 meses de cada genotipo. Cada determinación se hizo por triplicado, se normalizó frente a β -actina y se representó como el nivel medio de expresión relativa en los ratones $\mu^{-/-}$ en comparación con el nivel obtenido en los animales wt (ver materiales y métodos).

Los ensayos de expresión génica y su comprobación por RT-PCR sugieren que los ratones deficientes en pol μ muestran una reducción de la apoptosis y de varios genes diana de p53. Para comprobar si los datos de expresión efectivamente reflejan una disminución de la apoptosis en estos ratones, realizamos un ensayo de túnel en criocortes de los mismos hígados empleados en los *arrays* de expresión (fig. 16). Los resultados mostraron un drástico descenso en el porcentaje de células apoptóticas (células positivas) en los hígados $\mu^{-/-}$ respecto a los controles (6,3 % en los wt, frente al 0,5% en los $\mu^{-/-}$; $p < 0,0001$).



El conjunto de los datos indica que los procesos de apoptosis se encuentran menos activados en el hígado de ratones $\mu^{-/-}$ que en el de los controles.

2. ENVEJECIMIENTO EN EL CEREBRO DE RATONES $\mu^{-/-}$.

La disminución en ciertos procesos apoptóticos puede estar contribuyendo a retrasar el envejecimiento cerebral en los ratones $\mu^{-/-}$.

El comportamiento observado en los ratones $\mu^{-/-}$ de más de 6 meses de edad, que parecían sufrir “parálisis por estrés” cuando se les cambiaba de cubeta, nos sugirió que μ podría tener un papel en el sistema nervioso central. Para analizar este fenotipo, se contactó con el grupo de la Dra. Gruart y del Dr. Delgado, expertos en este campo. Dicho laboratorio obtuvo resultados que le permitieron concluir que la función cerebral de los ratones $\mu^{-/-}$ se deteriora más lentamente que la de los wt ([Lucas D, Delgado-García JM, Escudero, B., artículo en revisión](#)), pues estos ratones presentan una mayor preservación de las habilidades cognitiva y de aprendizaje. De nuevo, estos datos apoyan la hipótesis de que la ausencia de μ retrasa el envejecimiento.

La conexión entre factores de reparación del DNA implicados en NHEJ y la homeostasis del sistema nervioso central ya se ha estudiado previamente en ratones deficientes en Ku, LigIV $^{-/-}$ y Xrcc4 $^{-/-}$, que presentan apoptosis neuronal en estadios embrionarios (aunque es más severa en los dos últimos casos) ([Frank, Sekiguchi et al. 1998](#); [Gao, Sun et al. 1998](#)). Teniendo en cuenta que los procesos apoptóticos están disminuidos el hígado de los ratones $\mu^{-/-}$, decidimos analizar la expresión de genes incluidos en estos procesos o inducibles por p53. Encontramos 3 genes relacionados con la apoptosis que están negativamente regulados en el cerebro de los ratones $\mu^{-/-}$ viejos (14 meses) (fig. 17a).

1) **Bid**, cuya expresión está marcadamente disminuida en las muestras de los ratones $\mu^{-/-}$ viejos. Sin embargo, ninguno de los restantes genes inducibles por p53 analizados (p21, Perp y Pten) mostró estar regulado a la baja.

2) **Egln3**, inductor de apoptosis neuronal, también se encuentra regulado a la baja en el cerebro de los ratones $\mu^{-/-}$ viejos. De hecho, no es detectable en los cerebros de los ratones deficientes en μ .

3) **Acin1** con un nivel de expresión ligeramente (aunque no significativamente) disminuida en el cerebro $\mu^{-/-}$ viejo.

La expresión de Egln3 no es detectable antes de los 14 meses, momento en el que sólo la detectamos en uno de los wt (datos no mostrados). Al comparar los niveles de expresión de Bid, el otro gen indicador de apoptosis que encontramos desregulado de forma significativa, observamos que su expresión en los ratones viejos (11, 14 y 19 meses) respecto a los jóvenes (2 meses) aumenta un 55% más en los wt que en los $\mu^{-/-}$ (fig.17c). El conjunto de los resultados sugiere que la disminución en la apoptosis neuronal puede estar contribuyendo al menor deterioro de la función cerebral en los ratones $\mu^{-/-}$ viejos.

La inflamación y el transporte electrónico son otros dos procesos relacionados con el envejecimiento fisiológico ([Prolla 2002](#); [Krabbe, Pedersen et al. 2004](#); [Zahn, Sonu et al. 2006](#)). Analizamos la expresión de diferentes genes involucrados en dichos procesos, pues la disfunción hallada en la apoptosis no es de una magnitud tal como para explicar totalmente el menor deterioro de la función cerebral mostrado por los ratones $\mu^{-/-}$. En lo que respecta al proceso inflamatorio, analizamos los niveles de mRNA de 6 genes, y sólo **C1qa**, componente del sistema de complemento, mostró una disminución apreciable. No hemos encontrado diferencias significativas en otras 3 proteínas del mismo sistema (C5a, receptor de C3a (C3aR) y C5l2), ni en Gfap, marcador de astrocitosis reactiva inducida en cerebro envejecido ([Prolla 2002](#)) (fig. 17b). En los valores medio de expresión de Cox2 es inferior en el hígado wt, pero los niveles muestran una gran variabilidad interindividual.

Comparamos la expresión de C1qa en ratones jóvenes (2 meses) y viejos (11, 14 y 19 meses), y observamos patrón de expresión acorde con un envejecimiento retardado en los ratones $\mu^{-/-}$: los niveles de C1qa aumentan 26 veces en el cerebro wt viejo respecto al joven, mientras que sólo aumentan 12 veces en el cerebro $\mu^{-/-}$. El transporte electrónico no se ve alterado de forma significativa, según muestran los niveles de expresión de los 5 genes analizados (Mrpl28, Mrsl12, Timm17a, Ndufa10, Atp5a) (fig.17d).

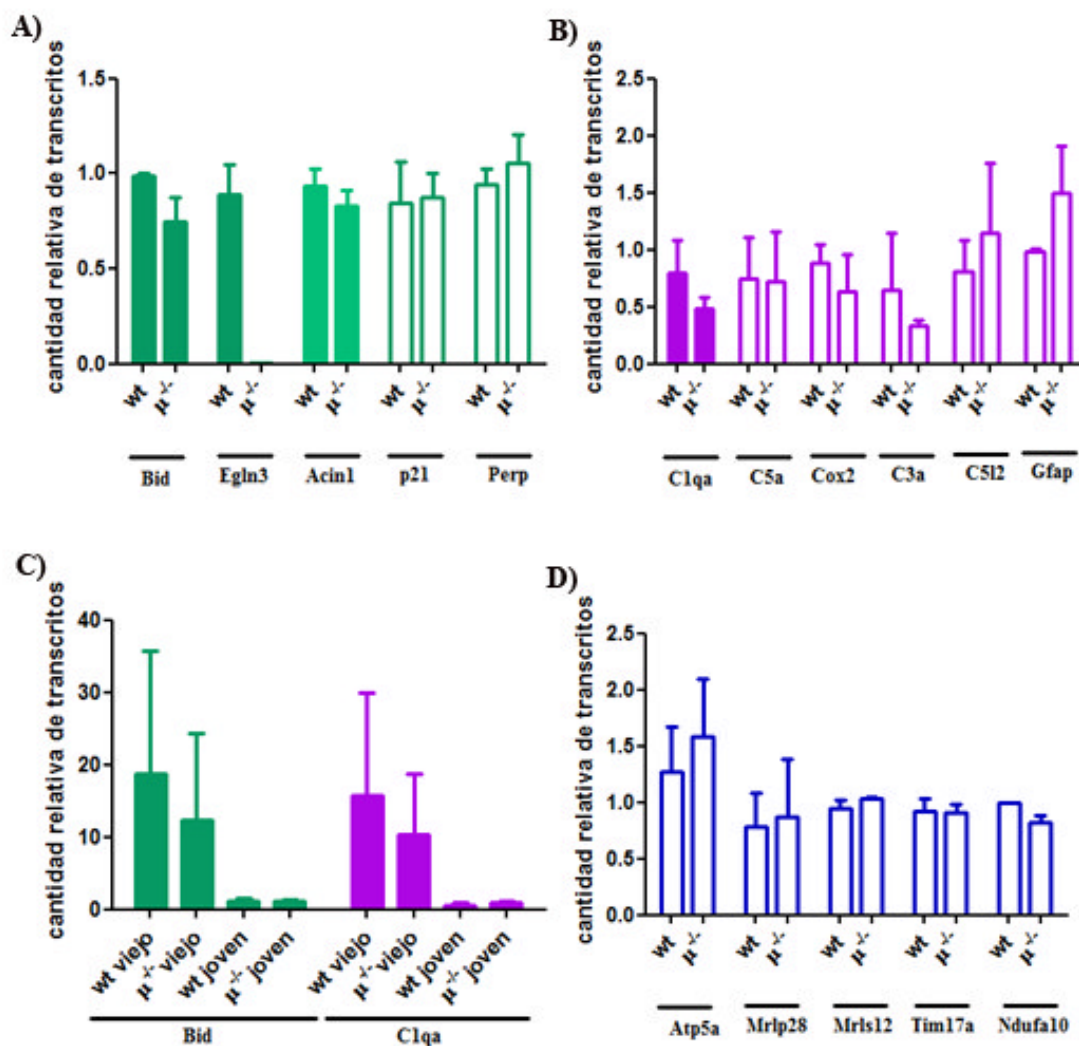


Figura 17. Expresión diferencial de procesos involucrados en el envejecimiento del cerebro, en ratones wt y $\mu^{-/-}$. Los niveles de mRNA se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa con sondas TaqMan en cerebros de ratones wt y $\mu^{-/-}$. Cada determinación se hizo por triplicado, se normalizó frente a un gen β -actina y se representó como el nivel medio de expresión relativa en los ratones $\mu^{-/-}$ en comparación con el nivel obtenido en los animales wt (ver materiales y métodos). **A)** Expresión de genes involucrados en apoptosis y/o inducibles por p53 en ratones viejos (n=2; 14 meses de edad). **B)** Expresión de genes involucrados en el proceso de inflamación en ratones viejos (n=2; 14 meses de edad). **C)** Expresión de Bid y C1qa en ratones jóvenes (n=4; 2 meses de edad) y viejos (n=8; 11, 14 y 19 meses de edad), en comparación con los niveles obtenidos en los animales wt jóvenes. **D)** Expresión de genes involucrados en el transporte electrónico en ratones viejos (n=2; 14 meses de edad).

En su conjunto, los datos sugieren que, de los tres procesos descritos como contribuyentes al envejecimiento cerebral (apoptosis, inflamación y transporte electrónico), sólo la disminución en la apoptosis podría estar favoreciendo que la función cerebral del ratón $\mu^{-/-}$

^{-/-} se deteriore más lentamente que la del wt. Pero parece improbable que únicamente la disminución de los niveles de Bid y Egl3 sea suficiente (en ausencia de la inhibición de otros genes implicados en procesos apoptóticos) para afectar significativamente al proceso de envejecimiento cerebral. Una explicación alternativa y no excluyente es que el retraso en el deterioro de la función cerebral mostrado por los ratones $\mu^{-/-}$ se deba, en mayor medida, a un incremento en la actividad de HR para compensar un mecanismo de NHEJ menos eficiente, lo cual conllevaría una mayor fidelidad en la reparación del DNA y, por tanto, una menor acumulación de mutaciones durante el envejecimiento en el cerebro de los ratones $\mu^{-/-}$.

3. ENVEJECIMIENTO EN EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO DE RATONES $\mu^{-/-}$.

3.1. ESTABILIDAD CROMOSÓMICA.

La alteración de la ploidía es una forma de inestabilidad cromosómica y, como tal, está asociada al envejecimiento. De la misma forma que el grado de poliploidía se incrementa durante el envejecimiento en hígado, existen evidencias de un aumento de la tasa de aneuploidías a medida que el organismo envejece. Dicho aumento ha sido descrito en cultivos de linfocitos humanos (Jacobs, Court Brown et al. 1961; Jacobs, Brunton et al. 1963). El incremento de las aneuploidías con la edad también se pone de manifiesto en fibroblastos: en estas células, el nivel de aneuploidías se incrementa con el número de pases en cultivo, a medida que las células se acercan a la entrada en senescencia (Mukherjee and Costello 1998). Además, los fibroblastos procedentes de humanos con determinados síndromes de progeria, muestran un nivel basal de aneuploidías y un incremento con el número de pases superior al de los controles (Mukherjee and Costello 1998).

Los datos de poliploidía en hígado nos llevaron a pensar que la estabilidad cromosómica del sistema hematopoyético podría también preservarse en mayor grado durante el envejecimiento de los ratones $\mu^{-/-}$. Para responder a tal pregunta, realizamos preparaciones cromosómicas de la médula ósea *in vivo* de ratones wt y $\mu^{-/-}$ de 17,5 y 25 meses de edad. Estas muestras se hibridaron con sondas de *painting* cromosómico de los cromosomas 1, 2 y 3 (figura 18). Este ensayo nos permitiría ver translocaciones de cualquiera de estos cromosomas y, simultáneamente, analizar la ploidía. Los datos sugieren una tendencia por parte del ratón $\mu^{-/-}$ a un incremento de la inestabilidad cromosómica con la edad, pues la médula ósea $\mu^{-/-}$ muestra un mayor porcentaje de metafases aneuploides y de metafases con translocaciones (tabla 5). Por tanto, parece que, al menos en médula ósea, la ausencia de pol μ conlleva una menor preservación de la estabilidad cromosómica del sistema hematopoyético durante el envejecimiento.

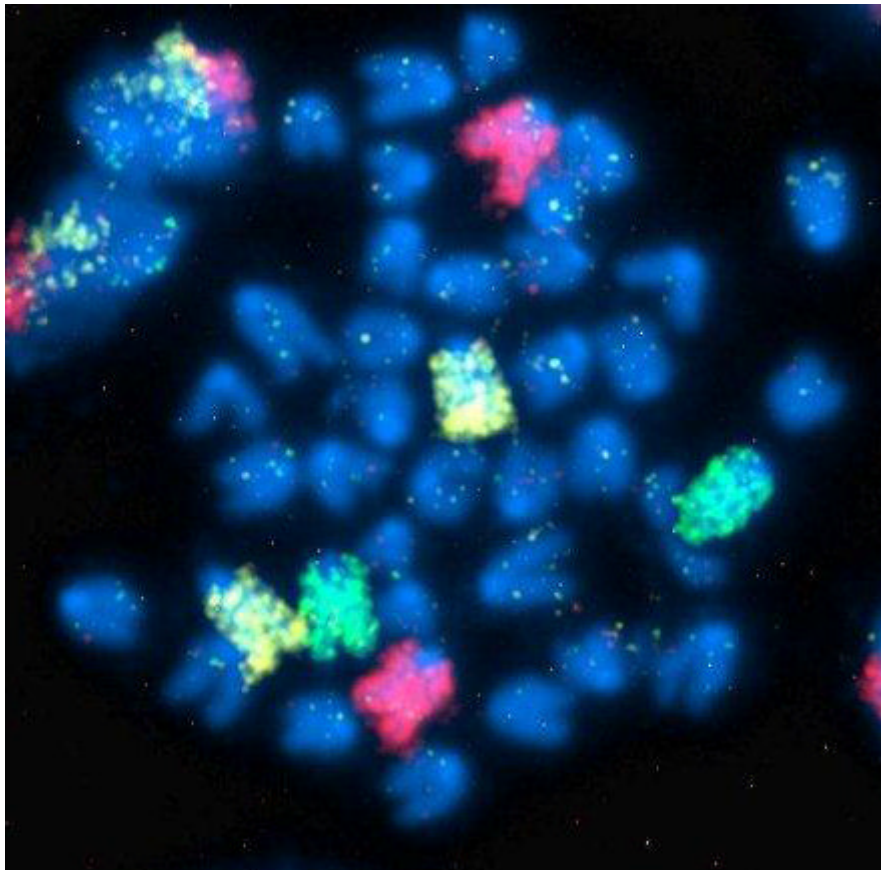


Figura 18. Ejemplo ilustrativo de la técnica de painting. En rojo (Cy3), el cromosoma 1; en verde (FITC), el cromosoma 2; en amarillo (Cy5), el cromosoma 3.

genotipo	% metafases aneuploides	% metafases con translocaciones
wt	12,88	0
$\mu^{-/-}$	18,24	2,7

Tabla 5. Aneuploidías y translocaciones de los cromosomas 1, 2 y 3 en médula ósea de ratones viejos wt y $\mu^{-/-}$. Se muestra el valor promedio del porcentaje de metafases (n en wt= 163; n en $\mu^{-/-}$ = 148) aneuploides o con translocaciones de los cromosomas 1, 2 y 3 en células de médula ósea procedente de ratones wt y $\mu^{-/-}$ (n=5 por genotipo; 2 de 17,5 meses y 3 de 25 meses de edad).

La ausencia de pol μ puede implicar una menor tasa de mutaciones en la reparación del DNA, pero también una disminución en la eficacia de mecanismo de NHEJ. Esto podría conllevar un incremento en la activación de HR en un intento por parte de la célula de compensar el defecto de NHEJ, como sugieren los datos *in vitro* (fig.12). Por ello, analizamos los niveles de SCE en linfocitos B. Los datos no mostraron diferencias significativas entre las células wt y $\mu^{-/-}$ (fig. 19). Teniendo en cuenta que SCE es un producto de HR cuando dicha vía no es completamente fiel, puede que la cantidad de DSBs que deben ser reparadas por HR no sean suficientes como para incrementar de manera significativa la tasa de entrecruzamientos entre cromátidas hermanas.

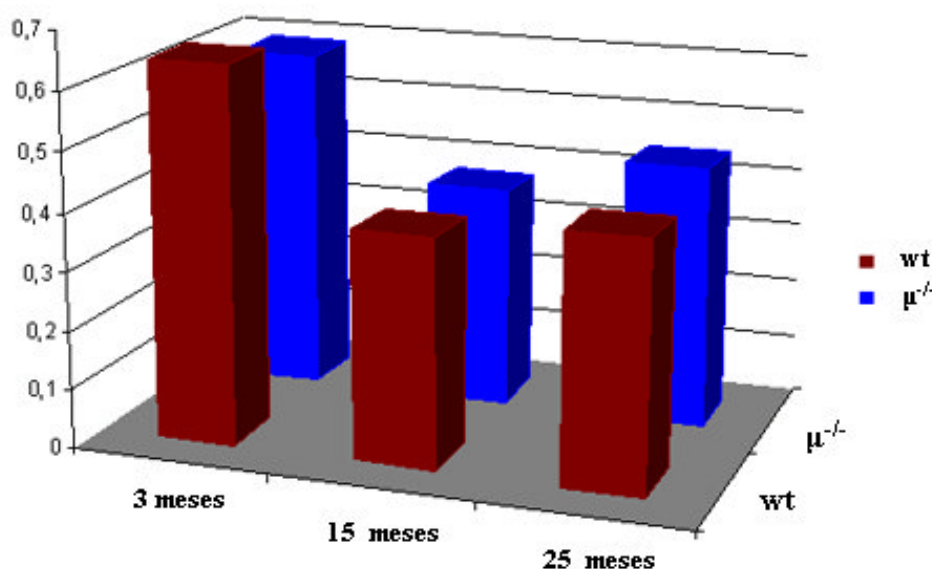


Figura 19. Niveles de SCE linfocitos B purificados de bazo wt y $\mu^{-/-}$. Se representan los valores promedio de 3 ratones por genotipo y edad (3, 15 y 25 meses), habiendo analizado 10 metafases por ratón.

3.2. ACUMULACIÓN DE ROS.

El timo y el bazo de los ratones acumulan menos ROS durante el envejecimiento.

El daño oxidativo como causa de deterioro celular constituye una de las teorías más aceptadas sobre el envejecimiento (Beckman and Ames 1998). Analizamos los niveles de peróxidos con DCFDA en timo y bazo comparando ratones viejos (19 meses de edad) y jóvenes (2 meses de edad) de ambos genotipos. Aunque las diferencias no son significativas, bazo y timo muestran la misma tendencia: los niveles de ROS en los órganos $\mu^{-/-}$ son similares a los de los controles en los ratones jóvenes, pero, en los ratones viejos, los niveles acumulados en los $\mu^{-/-}$ son inferiores a los acumulados en los controles (un 25% menos en el timo y en 15% menos en el bazo) (fig.20).

Los datos sugieren dos alternativas: 1) que la menor acumulación de ROS con el paso del tiempo es un factor contribuyente a la mayor longevidad de los ratones $\mu^{-/-}$ o 2) que el menor nivel de ROS es indicativo de una mejor funcionalidad, acorde con un sistema más joven (al menos, en bazo y timo).

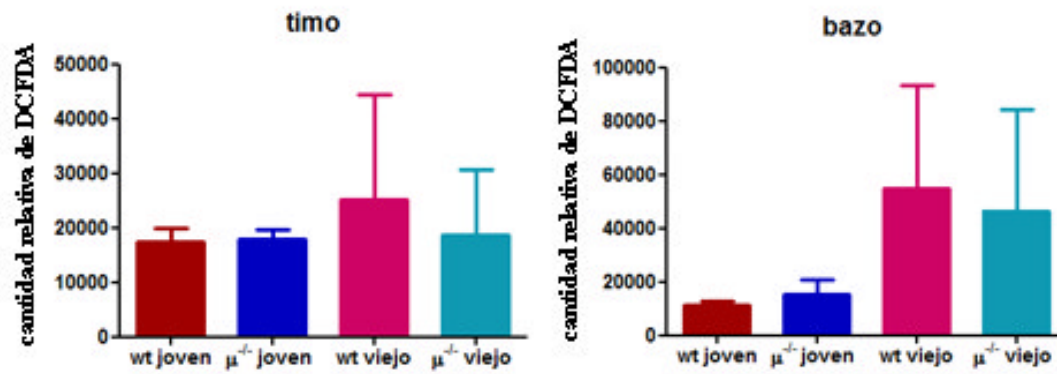


Fig 20. Niveles de ROS mediante citometría de flujo en timo y bazo de ratones wt y $\mu^{-/-}$, jóvenes (2 meses) y viejos (19 meses). Se representa el nivel promedio (n=3) de DCFDA, indicador de la cantidad relativa de peróxidos.

II. INTERACCIÓN entre POL μ y P53. DEFICIENCIA de POL μ en un ENTORNO DEFICIENTE en P53.

La decisión de estudiar la función de pol μ en un entorno genético deficiente en p53 surgió a raíz de dos hechos principalmente:

- 1) Puesto que hemos visto que el requerimiento de pol μ se pone de manifiesto en condiciones de estrés genotóxico, un ambiente deficiente en p53, donde las células van acumulando daño sin entrar en apoptosis (Chen, Ko et al. 1996; Appella and Anderson 2001), podría proporcionarnos una mayor comprensión de la función de esta polimerasa.
- 2) Los ratones deficientes en los principales factores de NHEJ presentan una predisposición a desarrollar linfomas relativamente baja porque las células con roturas no reparadas son eliminadas por acción de P53 (Guidos, Williams et al. 1996; Nacht, Strasser et al. 1996; Frank, Sharpless et al. 2000; Gao, Ferguson et al. 2000). La inactivación de P53 posibilita la supervivencia de los linfocitos deficientes en NHEJ, por lo que los ratones dobles deficientes en p53 y en NHEJ presentan un desarrollo temprano de linfomas pro-B. Por tanto, la delección de p53 facilitaría el estudio de la función de pol μ en la formación de tumores.

A. Datos previos.

En nuestro laboratorio, ya se había estudiado la linfomagénesis en los ratones $\mu^{-/-}$ en fondo BalbC/129sv (Lucas, Tesis Doctoral 2005). Para tal estudio, se empleó un procedimiento de inducción de tumores mediante irradiación γ (dosis bajas y repetidas) en las semanas previas al destete (Tong, Cortes et al. 2002). No se observaron diferencias significativas entre los ratones wt y los $\mu^{-/-}$, lo que sugiere que la ausencia de pol μ no afecta al proceso de tumorigénesis inducido irradiación.

B. Generación del ratón $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$.

Para estudiar la posible sinergia entre la reparación mediada por pol μ y p53, generamos el modelo murino doble deficiente en pol μ y p53 ($\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$). Para ello, tuvimos que rederivar previamente la línea pol μ a un fondo genético puro C57BL/6, mismo fondo en el que se encontraban los ratones p53 $^{-/-}$.

C. Caracterización del ratón $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$.

1. CARACTERIZACIÓN A NIVEL CELULAR: MEFs $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$.

Nuestro primer paso para el estudio del papel de pol μ en un entorno deficiente en p53 fue la caracterización de MEFs.

a) La delección de p53 incrementa la capacidad replicativa de los MEFs $\mu^{-/-}$ e impide su entrada en senescencia.

Comenzamos por el estudio de la proliferación de estas células en incubadores convencionales al 20% de O₂ (fig.21). Los resultados fueron absolutamente inesperados, pues los MEFs deficientes en pol μ ($\mu^{-/-}$ p53 $^{+/+}$, que abreviaremos como $\mu^{-/-}$) no mostraban el mismo fenotipo que los de la línea pol μ de fondo Balbc x 129sv: aunque el crecimiento está ligeramente retardado con respecto a los wt, no muestran senescencia prematura. Tampoco se observa ninguna diferencia en el crecimiento entre los MEFs únicamente deficientes en p53 ($\mu^{+/+}$ p53 $^{-/-}$, que abreviaremos como p53 $^{-/-}$) y los dobles deficientes ($\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$).

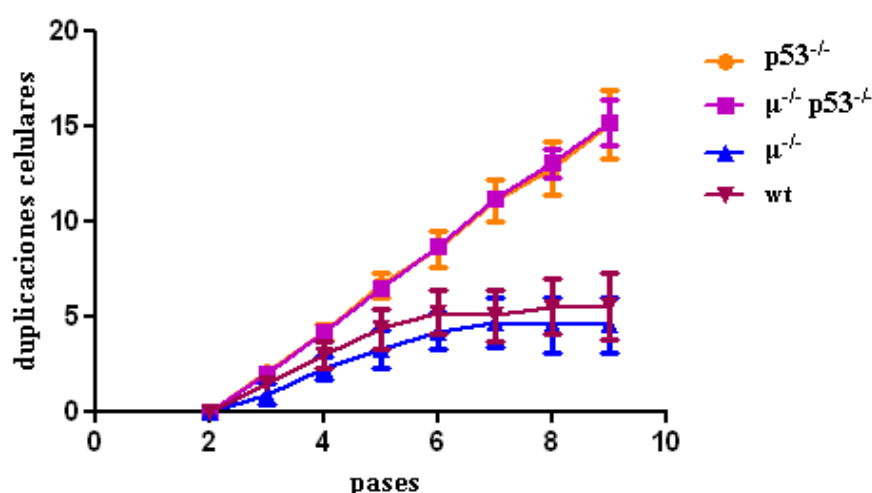


Figura 21. Ensayo 3T3 con MEFs. Curva de crecimiento de wt, $\mu^{-/-}$, p53 $^{-/-}$ y $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$. Se emplearon 6 embriones de cada genotipo para los MEFs p53 $^{-/-}$ y $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ y 3 embriones para los MEFs wt y $\mu^{-/-}$.

Para caracterizar en mayor profundidad la proliferación, analizamos el ciclo celular de los MEFs en pase 5. La tinción con ioduro de propidio no mostró diferencias entre los MEFs wt y $\mu^{-/-}$, ni entre los p53 $^{-/-}$ y los $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ (figura 22a). Realizamos los mismos ensayos 48 horas después de haber irradiado las células con 5 Gy, y tampoco observamos diferencias significativas en el ciclo celular (figura 22a).

Otra forma de caracterización de estas células fue el ensayo de formación de colonias, que correlaciona grado de inmortalización de las mismas. Los resultados tampoco mostraron diferencias, ni en condiciones basales ni tras la inducción de daño genotóxico con H₂O₂ (figuras 22b).

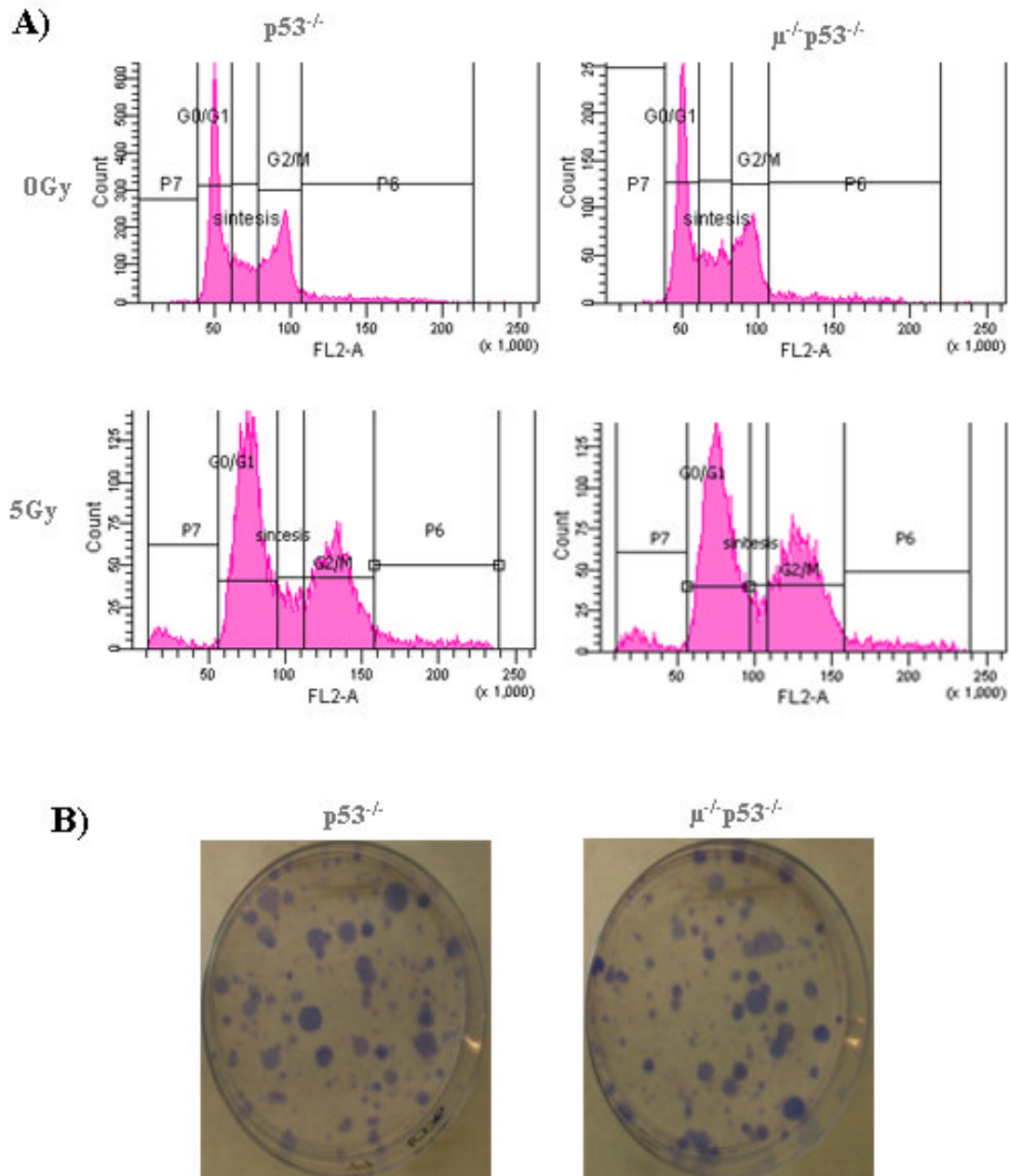


Figura 22. Análisis de la proliferación de los MEFs. A) Imágenes representativas del ciclo celular de MEFs $p53^{-/-}$ y $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ en las condiciones de cultivo habituales y 48 horas tras la irradiación. **B)** Imágenes representativas del ensayo de formación de colonias en MEFs $p53^{-/-}$ y $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ tras tratamiento con H_2O_2 al 0,0001%. Se analizaron por triplicado MEFs en pase 2 procedentes de 3 embriones por genotipo. Se sembraron 1000 células en cada placa de 100 mm^2 . Las placas se fijaron 12 días después y se tiñeron con Giemsa.

b) Los MEFs $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ muestran mayor grado de inestabilidad cromosómica que los $p53^{-/-}$.

Los MEFs dobles deficientes en p53 y algún factor principal de NHEJ muestran mayor inestabilidad genética que los MEFs $p53^{-/-}$. Las células deficientes en NHEJ no pueden

reparar las DSBs generadas en el cultivo y estas roturas dan lugar a aberraciones cromosómicas a medida que la célula se duplica. Debido a la ausencia de p53, estos MEFs NHEJ^{-/-}p53^{-/-} se duplican rápidamente, acumulando aberraciones sin entrar en senescencia.

Analizamos la estabilidad de los MEFs procedentes de los ensayos de proliferación mediante FISH con una sonda telomérica para la correcta identificación de las aberraciones cromosómicas (figura 23). A diferencia de los resultados observados con la línea pol μ en fondo BalbC x 129sv, los MEFs $\mu^{-/-}$ no muestran un fenotipo más aberrante que los wt, lo que sugiere que, en fondo C57BL/6, el estrés proporcionado por el cultivo no es suficiente como para requerir la acción de pol μ . Sin embargo, los resultados muestran un incremento significativo ($p=0,025$) del número de roturas en los MEFs $\mu^{-/-}$ p53^{-/-} (0,91 roturas por metafase) respecto a los p53^{-/-} (0,58 roturas por metafase), lo que sugiere el requerimiento de pol μ en condiciones de estrés (proporcionado por el cultivo) en ausencia de p53. Pol μ proporciona a la célula una reparación mutagénica pero rápida. Por ello, las células deficientes simultáneamente en p53 (cuya ausencia aumenta la velocidad de replicación del cultivo) y pol μ no son capaces de reparar las roturas generadas en el cultivo antes de la siguiente división celular, lo que conlleva la aparición de roturas cromosómicas y otras aberraciones estructurales.

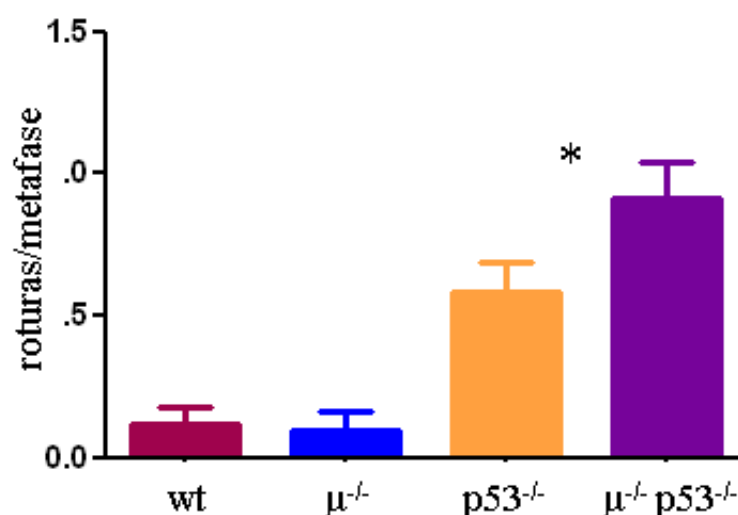


Figura 23. Análisis de estabilidad cromosómica mediante FISH telomérico en MEFs wt, $\mu^{-/-}$, p53^{-/-} y $\mu^{-/-}$ p53^{-/-} (pase 2-3). Se representa el valor promedio a partir de 6 embriones de cada genotipo y 25 metafases de cada embrión ($n=150$ metafases) en el caso de los MEFs p53^{-/-} o los $\mu^{-/-}$ p53^{-/-}, pero el valor promedio es a partir de 2 embriones ($n=50$ metafases) en el caso de los wt o los $\mu^{-/-}$.

2. CARACTERIZACIÓN DEL EMBRIÓN $\mu^{-/-}$ p53^{-/-}.

La función de p53 en el desarrollo del embrión aún no ha sido completamente elucidada. Se conocen detalles sobre su expresión, pero menos de sus dianas. Sin embargo, ya han sido descritas interacciones entre p53 y genes de reparación en el desarrollo embrionario, como es el caso de los embriones LigIV^{-/-}p53^{-/-} y Xrcc4^{-/-}p53^{-/-}, que son viables gracias a que la delección de p53 rescata la apoptosis neuronal masiva que provoca la deficiencia en LigIV o Xrcc4 (Frank, Sekiguchi et al. 1998; Gao, Sun et al. 1998; Frank, Sharpless et al. 2000; Gao, Ferguson et al. 2000). Por ello, nos propusimos estudiar cómo afecta la ausencia de pol μ en el desarrollo de los embriones p53^{-/-}. Nos hemos centrado en el

estudio de los defectos en el tubo neural (concretamente, exencefalia) durante el desarrollo embrionario.

La ausencia de pol μ no tiene efectos significativos ni en la viabilidad ni en la formación del tubo neural de los embriones deficientes en p53.

Iniciamos los cruces de ratones dobles heterocigotos ($\mu^{+/-}p53^{+/-}$ x $\mu^{+/-}p53^{+/-}$), pero, debido a la baja proporción de embriones $p53^{-/-}$ (0-1 embrión por parto), decidimos modificar los cruces de progenitores en función del genotipo buscado. No pudimos poner cruces $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ x $\mu^{-/-}p53^{-/-}$, porque los machos dobles deficientes no generan descendencia (aspecto pendiente de estudiar). Exceptuando los 3 primeros cruces, que se hicieron entre dobles heterocigotos, los demás han sido combinaciones de $\mu^{+/-}p53^{+/-}$, $\mu^{+/-}p53^{-/-}$ y de $\mu^{-/-}p53^{+/-}$. Estudiamos la distribución de los genotipos obtenidos a día 13.5 dpc en 157 embriones, para lo que comparamos las proporciones esperadas (mendelianas) con las proporciones obtenidas (reales). No observamos diferencias significativas entre dichas proporciones al deletar pol μ (ni en los embriones wt ni en los $p53^{+/-}$ o en los $p53^{-/-}$), lo que sugiere que la deficiencia en pol μ no tiene efecto sobre la viabilidad de los embriones (al menos, hasta día 13.5), ni en presencia ni en ausencia de p53 (datos no mostrados).

Cada embrión fue observado y fotografiado a la lupa en busca de anomalías en el tubo neural. No observamos ninguna alteración de este tipo en los embriones $\mu^{-/-}$ ni diferencias significativas en el número de embriones con exencefalia al comparar los $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ con los $p53^{-/-}$. Los datos sugieren que pol μ no tiene un papel importante en el desarrollo del tubo neural (figura 24).

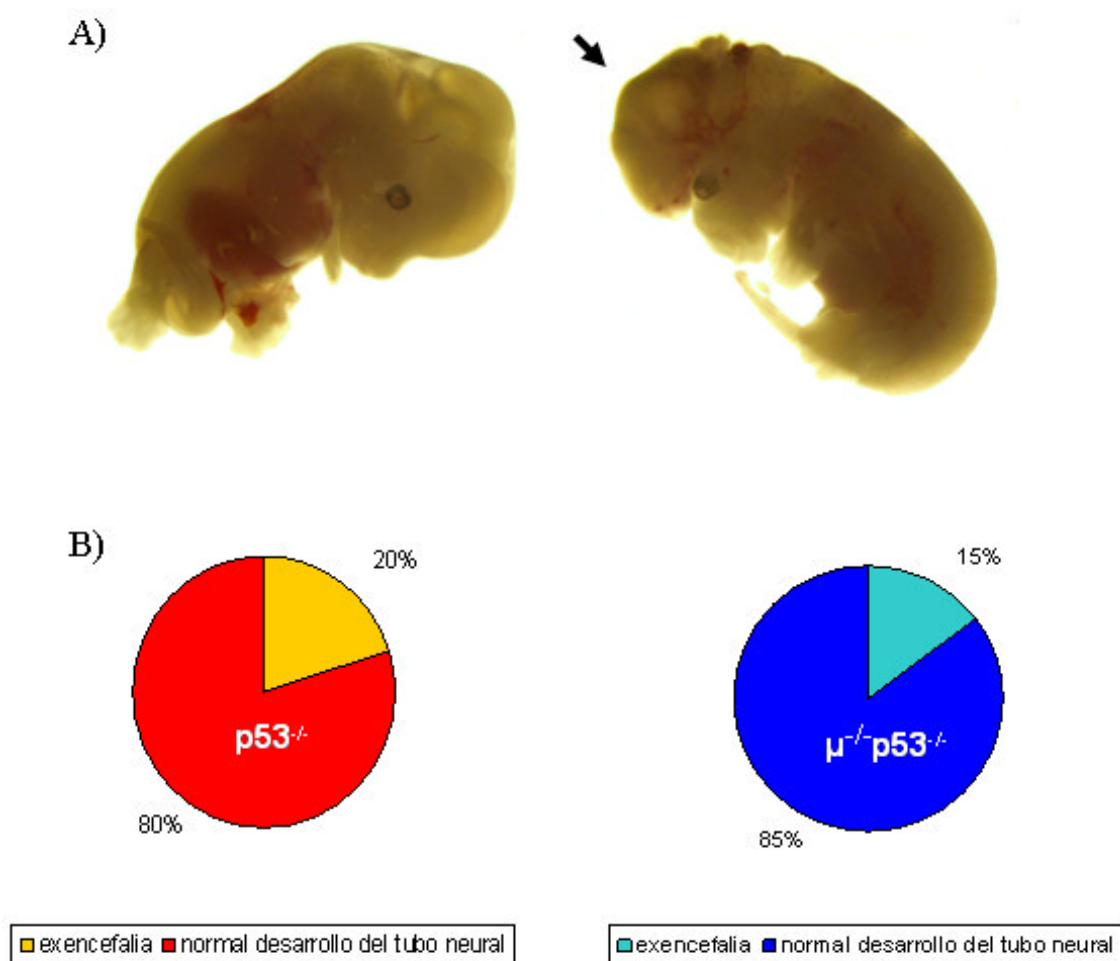


Figura 24. Estudio de exencefalia en los embriones $p53^{-/-}$ y $\mu^{-/-}p53^{-/-}$. A) Imágenes representativas de un embrión sin anomalías en el desarrollo del tubo neural (izquierda) y uno con exencefalia (derecha). B) Análisis de la incidencia de dicha alteración en los embriones $p53^{-/-}$ (izquierda; $n=15$) y $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ (derecha; $n=34$). Diagramas de las proporciones de embriones con exencefalia frente a las de embriones sin esta anomalía.

3. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA DE LA COLONIA $\mu:p53$.

Los ratones $p53^{-/-}$ mueren hacia los 6 meses de edad porque desarrollan tumores (Donehower, Harvey et al. 1992; Jacks, Remington et al. 1994). Nosotros quisimos ver cómo la ausencia de pol μ afectaba a la supervivencia de los ratones deficientes en $p53$, por lo que llevamos a cabo un seguimiento de la colonia durante aproximadamente 3 años. Observamos un efecto significativo de la ausencia de pol μ en la supervivencia media de los ratones $p53^{-/-}$ (valor p en el test de Mantel Cox = 0,0408) (fig. 25a). El tiempo de vida máximo no se ve afectado de manera significativa por la ausencia de pol μ ; sin embargo, la pendiente de la curva es más pronunciada en los ratones $\mu^{-/-}p53^{-/-}$. Todos los percentiles de los $p53^{-/-}$ se corresponden con un tiempo de vida superior al de los $\mu^{-/-}p53^{-/-}$: 1) el 75% de los $p53^{-/-}$ vive 129 días, siendo 99 días en los $\mu^{-/-}p53^{-/-}$; 2) si hablamos de un 50% de animales vivos, la diferencia es de 189 frente a 142; y 3) en el caso del 25%, de 217 frente a 180. Asimismo, la vida media es inferior en los $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ (141 días) que en los $p53^{-/-}$ (187 días).

Al analizar la supervivencia de los ratones en un fondo $p53^{+/-}$, observamos que la deficiencia en pol μ no tiene un efecto significativo, aunque existe una ligera tendencia en los $p53^{+/-}$ (fig. 25b).

En cuanto al efecto que pol μ tiene sobre la supervivencia cuando $p53$ está intacto (fig. 25c), podemos ver que hay una clara tendencia de los ratones $\mu^{-/-}$ a vivir más que los wt, aunque el efecto no es estadísticamente significativo. La vida media de los ratones wt es de 761 días, mientras que la de los $\mu^{-/-}$ es de 850.

La comparación de la supervivencia en los 6 genotipos mencionados de la línea pol $\mu:p53$ sugiere dos ideas importantes. La primera es que el efecto de la polimerasa sobre el envejecimiento (extensión de la longevidad) se ve atenuado en un fondo B6 con respecto al fondo mixto. La segunda, que la deficiencia de pol μ acorta la vida de los ratones $p53^{-/-}$ (pero no la de los $p53^{+/-}$).

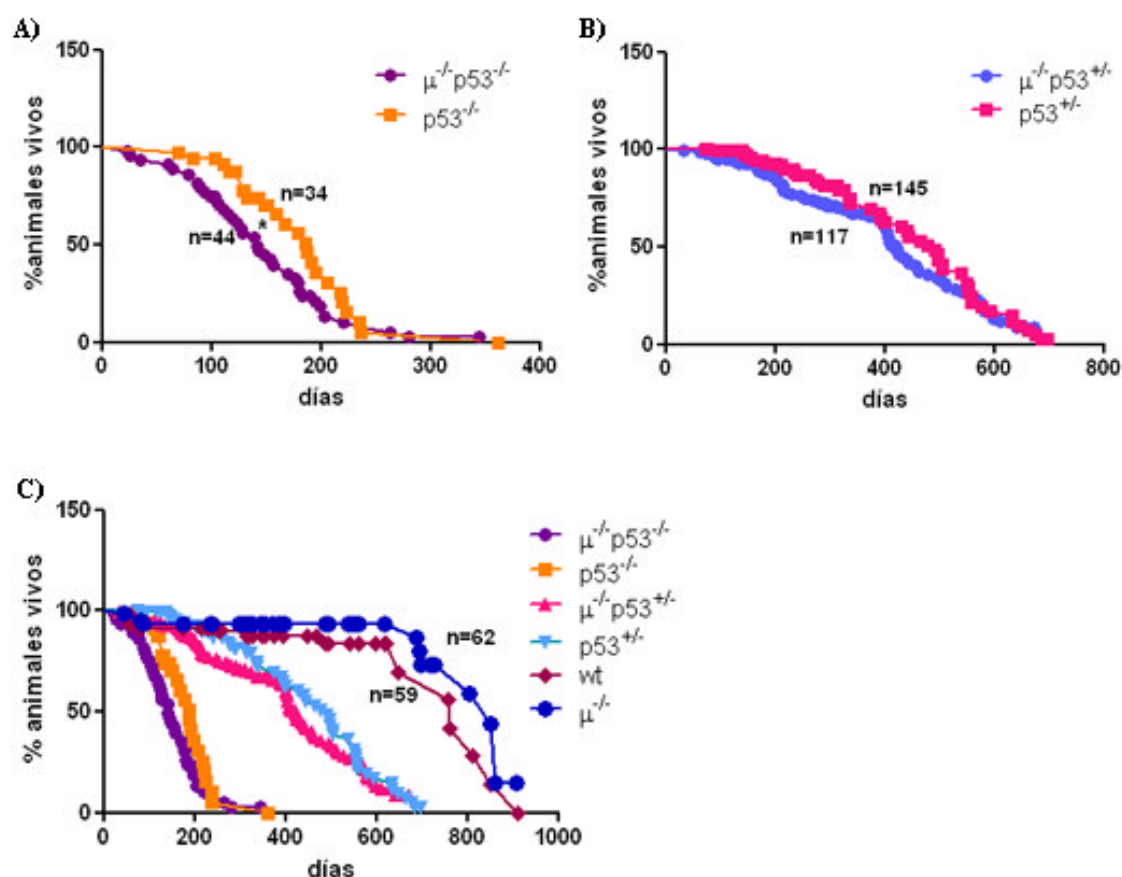


Figura 25. Supervivencia de los ratones de la línea pol μ -p53. A) Ausencia de pol μ en la supervivencia de los ratones $p53^{-/-}$. B) Ausencia de pol μ en la supervivencia de ratones $p53^{+/-}$. C) Ausencia de pol μ en la supervivencia de ratones $p53^{-/-}$, $p53^{+/-}$ y wt.

4. ESTUDIO DE TUMOROGÉNESIS EN EL RATÓN $\mu^{-/-} p53^{-/-}$.

Los ratones $p53^{-/-}$ son altamente propensos a desarrollar cáncer en los primeros meses después del nacimiento (Donehower, Harvey et al. 1992; Jacks, Remington et al. 1994). La delección de $p53$ genera un espectro tumoral caracterizado por el predominio de linfomas, principalmente afectando al timo (Jacks, Remington et al. 1994).

a) La ausencia de pol μ modifica el espectro tumoral de los ratones $p53^{-/-}$.

Para estudiar la contribución de pol μ al espectro tumoral, llevamos a cabo un estudio histopatológico de los tumores generados en los ratones $pol\mu:p53$. Para ello, realizamos una necropsia de cada animal en mal estado (entendiéndose como tal, la presentación de signos de sufrimiento, tumores visibles, cifosis o respiración fatigada). Los tumores encontrados fueron sometidos a un análisis patológico por Antonio Molina, patólogo del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

En este estudio, observamos que un 82% de los ratones $p53^{-/-}$ desarrolló linfomas y el 18% restante mostraba sarcomas y linfomas o tumores mixtos (linfoma y sarcoma). Sin embargo, en los ratones $\mu^{-/-}p53^{-/-}$, detectamos un 55% de linfomas frente a un 40% de sarcomas (y un 5% con linfoma y sarcoma). Estos datos sugieren que la deficiencia en pol μ modifica el espectro tumoral de los ratones $p53^{-/-}$, incrementando la incidencia de sarcomas (fig.26). Además, parece que la ausencia de pol μ limita la aparición de tumores múltiples (aunque habría que aumentar el número de muestras, especialmente en los ratones $p53^{-/-}$, para poder afirmarlo): 5 de los 11 ratones $p53^{-/-}$ presentan más de un tumor, mientras que sólo 1 de 20 ratones $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ presenta 2 tumores.

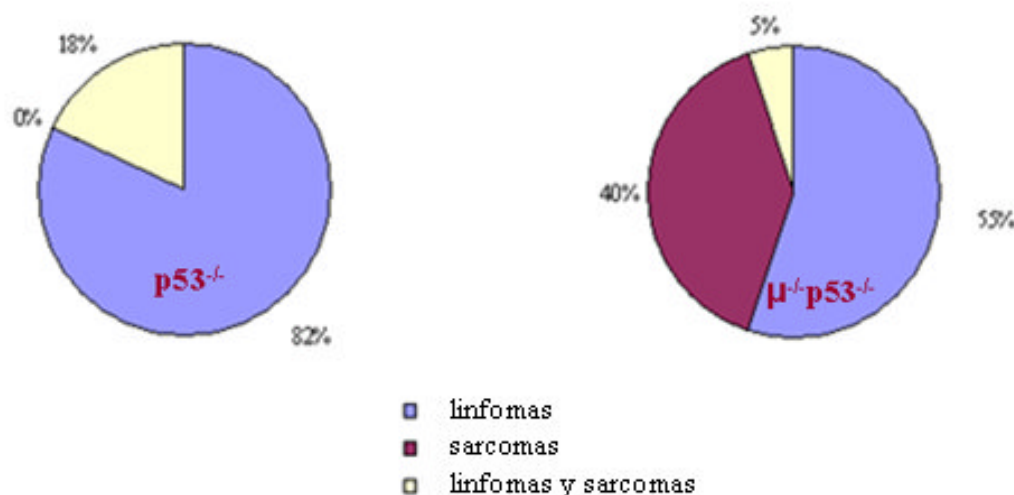


Fig 26. Espectro tumoral de los ratones $p53^{-/-}$ y $\mu^{-/-}p53^{-/-}$. Los ratones se clasificaron en 3 grupos, en función del tipo de tumor desarrollado. En el grupo *linfomas y sarcomas* se incluyen los ratones que desarrollaron ambos tipos de tumores o tumores mixtos (linfoma/sarcoma). A la izquierda, diagrama de las proporciones de ratones $p53^{-/-}$ (n= 11) con linfomas y/o sarcomas; y a la derecha, mismo diagrama para los ratones $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ (n= 20).

a) Presencia de una población *BT* en los linfomas $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ y $p53^{-/-}$.

Los ratones $p53^{-/-}$ desarrollan principalmente linfomas de células T con una proporción mayoritaria de células T $CD4^{+}CD8^{+}$ (dobles positivas) (Jacks, Remington et al. 1994), lo que sugiere que la transformación se da en linfocitos relativamente inmaduros (von Boehmer 1988).

Para caracterizar las poblaciones celulares presentes en los linfomas $p53^{-/-}$ y $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ de nuestra colonia, analizamos un grupo de linfomas de cada genotipo por citometría de flujo (tabla 6). Los datos confirman la presencia de linfocitos T dobles positivos en los timos tumorales (en 4 de 6 analizados). Pero, además, hemos observado una población de linfocitos que expresa marcadores de linaje B ($B220^{+}$) y de linaje T ($CD8^{+}$)

simultáneamente. La hemos denominado *población BT*. Esta población está presente en una proporción importante de linfomas (en 6 de 19 analizados), independientemente de su localización y genotipo. Esto sugiere que los eventos de transformación tienen lugar en una etapa muy temprana del desarrollo linfocitario.

genotipo	localización	poblaciones celulares
p53 ^{-/-}	bazo	B220 ⁺ CD8 ⁺
	bazo	B220 ⁺
	bazo	T CD8 ⁺ y B220 ⁺ CD8 ⁺
	bazo	B220 ⁺
	bazo	B220 ⁺
	timo	T CD4 ⁺ CD8 ⁺
	timo	T CD4 ⁺ CD8 ⁺
	timo	T CD4 ⁺ CD8 ⁺
	timo	T CD8 ⁺
	timo	T CD4 ⁺ CD8 ⁺ y B220 ⁺ CD8 ⁺
	timo	T CD4 ⁺
μ ^{-/-} p53 ^{-/-}	bazo	B220 ⁺ CD8 ⁺
	bazo	B220 ⁺ y T CD8 ⁺
	bazo	B220 ⁺
	ganglio	B220 ⁺ ; B220 ⁺ CD8 ⁺ ; T CD8 ⁺
	timo	T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺
	timo	T CD8 ⁺ y T CD4 ⁺ CD8 ⁺
	timo	T CD8 ⁺ y B220 ⁺ CD8 ⁺
	timo	T CD8 ⁺

Tabla 6. Caracterización de las poblaciones celulares de linfocitos en linfomas p53^{-/-} y μ^{-/-}p53^{-/-}. En amarillo, se resaltan las muestras en las que se ha observado la población BT.

El siguiente diagrama (fig. 27) se corresponde con un ejemplo de un tumor de timo que contiene la población BT. En él se puede apreciar una población mayoritaria de linfocitos T dobles positivos, acorde con los datos publicados anteriormente (Jacks, Remington et al. 1994; Frank, Sharpless et al. 2000; Gao, Ferguson et al. 2000). La mayoría de las células CD8⁺ (simples positivas), que constituyen una pequeña parte de la población total, expresa también B220, tratándose de la población BT.

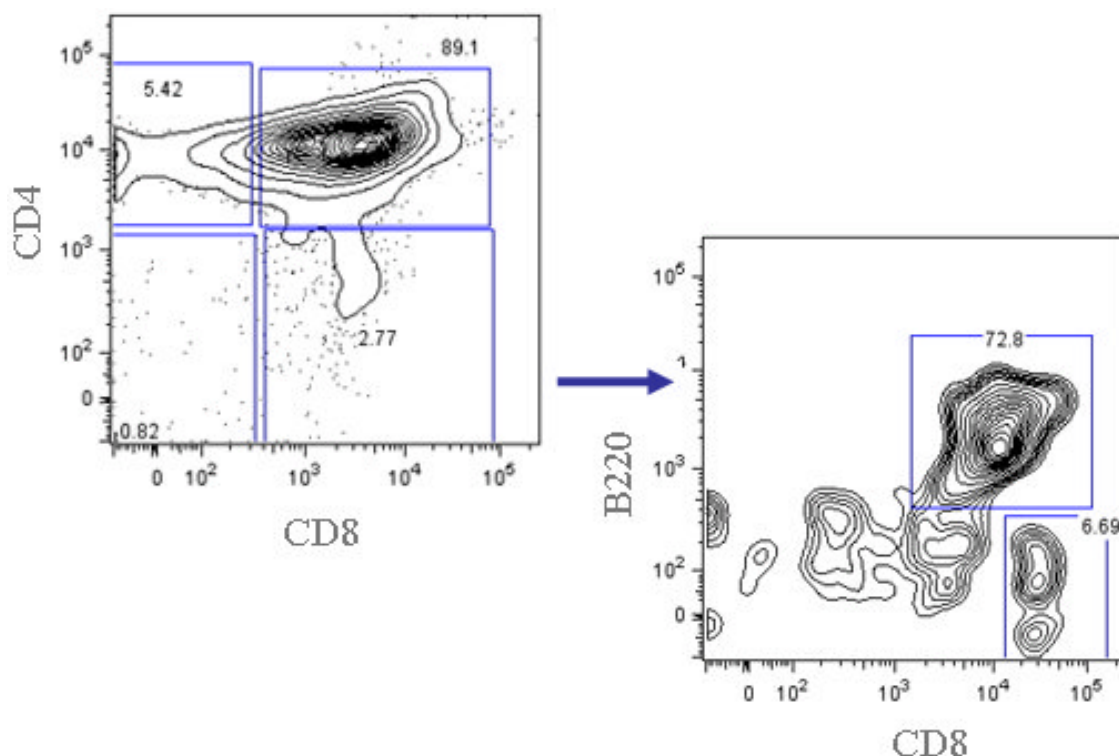


Figura 27. Ejemplo representativo de la población BT. En el gráfico de la izquierda, se representan los niveles de CD4 frente a los de CD8. Las células CD4⁺CD8⁺ se representan también en el gráfico de la derecha, enfrentando los niveles de B220 frente a los de CD8. Se muestra que más del 70% de las células CD8⁺ son también B220⁺.

c) Los linfomas p53^{-/-} y μ ^{-/-}p53^{-/-} presentan alteraciones frecuentes en el número de copia: amplificación de c-Myc y delecciones de Pten y de las cadenas α y β del TCR.

Ya se trate de humanos o de modelos murinos, la delección de p53 presenta una fuerte correlación con inestabilidad cromosómica *in vitro* e *in vivo* (Bischoff, Yim et al. 1990; Livingstone, White et al. 1992; Bouffler, Kemp et al. 1995; Donehower, Godley et al. 1995). Con objeto de observar si la ausencia de pol μ modificaba la inestabilidad que caracteriza a los tumores deficientes en p53, realizamos un análisis de la estabilidad genómica de los linfomas p53^{-/-} y μ ^{-/-}p53^{-/-}. Para ello, hibridamos las muestras de DNA tumoral en arrays de CGH (Comparative Genomic Hybridization), determinando así si existen alteraciones en el número de copia de alguna región o de un cromosoma completo (Kallioniemi, Kallioniemi et al. 1992).

Hemos considerado sólo aquellas alteraciones que se repiten en más de un 20% de los tumores de un genotipo dado. Entre este tipo de alteraciones, hemos encontrado 4, las cuales han resultado ser comunes a los dos genotipos:

1) La primera alteración se encuentra en el cromosoma 15, que contiene **c-Myc** (alteración que aparece marcada en negrita y azul en la tabla 7). En todas las muestras donde se presenta esta alteración, el 99% del cromosoma está triplicado, excepto en un tumor p53^{-/-}, en que sólo se encuentra amplificado el fragmento cromosómico correspondiente a c-Myc. Estos datos concuerdan con estudios previos en los que se observa la trisomía del cromosoma 15 como una alteración frecuente en los tumores deficientes en p53 (Spira, Wiener et al. 1979; Venkatachalam, Shi et al. 1998; Samper, Morgado et al. 2009). c-Myc es un oncogén que participa en la regulación de la

transcripción génica, con funciones clave en proliferación, supervivencia, y metabolismo celular (Dang, O'Donnell et al. 2006; Allday 2009). Los linfomas pro-B de los ratones dobles deficientes en un factor de NHEJ y p53 se caracterizan por albergar la translocación de c-Myc a un *locus* de Ig (Guidos, Williams et al. 1996; Nacht, Strasser et al. 1996; Vanasse, Concannon et al. 1999; Difilippantonio, Zhu et al. 2000; Frank, Sharpless et al. 2000; Gao, Ferguson et al. 2000; Lim, Vogel et al. 2000; Gladdy, Taylor et al. 2003). c-Myc encuentra incrementado su número de copia en 6 de 12 linfomas p53^{-/-}, pero sólo en 1 de 8 μ ^{-/-}p53^{-/-}, lo que sugiere que c-Myc no se amplifica de forma frecuente en los linfomas μ ^{-/-}p53^{-/-}.

2) La segunda alteración se localiza en el cromosoma 19. La región mínima común a todas las muestras es el *locus* de **Pten** (*Phosphatase and Tensin Homolog*), gen supresor de tumores (Manning and Cantley 2007) que, además, interviene en la homeostasis y la señalización de los linfocitos T (Liu, Karnell et al. ; Teng, Hu et al. 1997; Suzuki, Yamaguchi et al. 2001). Pten está delecionado en 5 de 8 linfomas de timo p53^{-/-} y en los 4 μ ^{-/-}p53^{-/-}. Estos datos difieren de los obtenidos por Venkatachalam y cols. (Venkatachalam, Shi et al. 1998), en los que la deleción de Pten no está entre las aberraciones frecuentes.

3 y 4) El receptor de los linfocitos T formado por las cadenas **TCR α** y **TCR β** . El *locus* de TCR α se encuentra en la región C2 del cromosoma 14 (14C2) y el del *locus* de TCR β , en la región B1 del cromosoma 6 (6B1). Como se refleja en la tabla 7, la deleción de estos *loci* es predominante. Los *loci* de las dos cadenas se encuentran delecionados en todos los tumores de timo analizados. De los 4 linfomas de bazo p53^{-/-}, 3 tienen delecionado el TCR α , y dos de ellos, además, el TCR β . Ninguno de los linfomas de bazo μ ^{-/-}p53^{-/-} presenta alteraciones en TCR α o β , mientras que dichas cadenas están delecionadas en el ganglio μ ^{-/-}p53^{-/-} (que, como sugiere el análisis por citometría de flujo, puede tener su origen en el timo). Estos datos también difieren de los de Venkatachalam y cols. (Venkatachalam, Shi et al. 1998), donde las alteraciones correspondientes al cromosoma 14 (no necesariamente incluyendo la región del TCR) son ganancias de DNA (no deleciones) y las alteraciones en el cromosoma 6 son poco frecuentes.

Estos datos, en su conjunto, sugieren que la deleción de las cadenas α y β del TCR, la deleción del supresor de tumores Pten y la amplificación del oncogén c-Myc son mecanismos que cooperan en la transformación tumoral en ausencia de p53. En la tabla 7 se muestran todas las aberraciones encontradas en cada uno de los tumores. Una descripción más detallada puede consultarse en el anexo. Hay un linfoma de timo de cada genotipo que contiene las cuatro aberraciones a la vez. En la figura 28a se representa, a modo de ejemplo, el cariotipo molecular de un tumor μ ^{-/-}p53^{-/-}.

En la página siguiente, se muestra la **Tabla 7. Alteraciones en el número de copia detectadas mediante aCGH**. Se indica si se trata de una amplificación (amp) o deleción (d), seguido del número del cromosoma y la región alterada:

genotipo	localización del linfoma	Cariotipo modal
$\mu^{+/+}p53^{-/-}$	BAZO	amp4D1-E2; d6B1 ; amp12A1.1-F2; d14C2 ; amp15D1
	BAZO	sin alteraciones en el número de copia
	BAZO	amp/d2a; d3(m); d8(m); d13A1-D2.3b; d14C2 ; d18
	BAZO	amp3 y amp5; amp11A1-E2; d14C2 ; amp15A1-F3
	TIMO	d6B1 ; amp6B3; d14C2 ; d19C2a; d19C2b
	TIMO	amp1A1-H6; ampA1-D2.2; amp5A1-F; d6B1 ; amp9A1; amp14A1-E5a; amp14A1-E5b; d14C2 ; amp15A1-F3 ; amp16B5-C4
	TIMO	amp3A1; d6B ; d10C2; d14C2 ; amp15A1-F3 ; d19C1 ; amp19C2a; amp19C2b
	TIMO	amp1; amp2A1-A3; amp4D1-E2; d6B1 ; d9E3.3-F4; amp11B4; d12; d13; amp14A1-E5; d14C2 ; amp14C2-D3; d18; d19A-D3
	TIMO	amp5A1-G3; d6B3; d6B1 ; amp6B3; d10C1; d10C2; d11B4; d11e1; d13B3; amp13D1; d14C2 ; amp16C4; d17e4; d19C1 ; ampXA1.1-F5
	TIMO	amp1A1-H6; amp2A1-H4; amp4A1-E2; amp5A1-G3; d6B1 ; amp8A1.1-E2; amp9A1-D; amp10A1-D3; amp11A1; amp11B1.3-E2; amp12A1.1-F2; amp13B3; amp14A1-E5; d14C2 ; amp15A1-F3 ; d16A1; amp16B1-C4; amp18A1-D1; d19C1 ; ampXA1.1-F5
	TIMO	d2A1-H4; d3A1-H4; d6B1 ; amp6B3; d7A1-D3; d9; amp2A1-F2; d14C2 ; d16A1-B3; d19A-D3; d19AC1
	TIMO	d1; d2; amp2A1-B; d3A1-H4; d6B1 ; d8A1.1-E2; amp9; d13A1-D2.3a; d14C2 ; amp15 ; d16; d18A1-E4
$\mu^{-/-}p53^{-/-}$	BAZO	sin alteraciones en el número de copia
	BAZO	d6B3
	BAZO	sin alteraciones en el número de copia
	GANGLIO	d3; d5G1.2-G1.3; amp5G1.3; amp5G2; amp5G3a; d5G3b; d6B1 ; d11D; d13A3.3-D2.3; d14C2 ; amp17B1E5
	TIMO	d19A-D3 ; d12
	TIMO	amp5A1-G3; d6B1 ; amp10; d14C2 ; d17A3.3-E5; d19C1
	TIMO	amp5A3-G3; amp11; d17D-E1.1; d19C1D3 ; dXA1.1-F5
	TIMO	d1E3; d1E4; amp3G3; amp5A1-G3; d6B1 ; d7F3; amp9C; amp11A4-E2; d14C2 ; amp15A1-F3 ; d19C1 ; d19

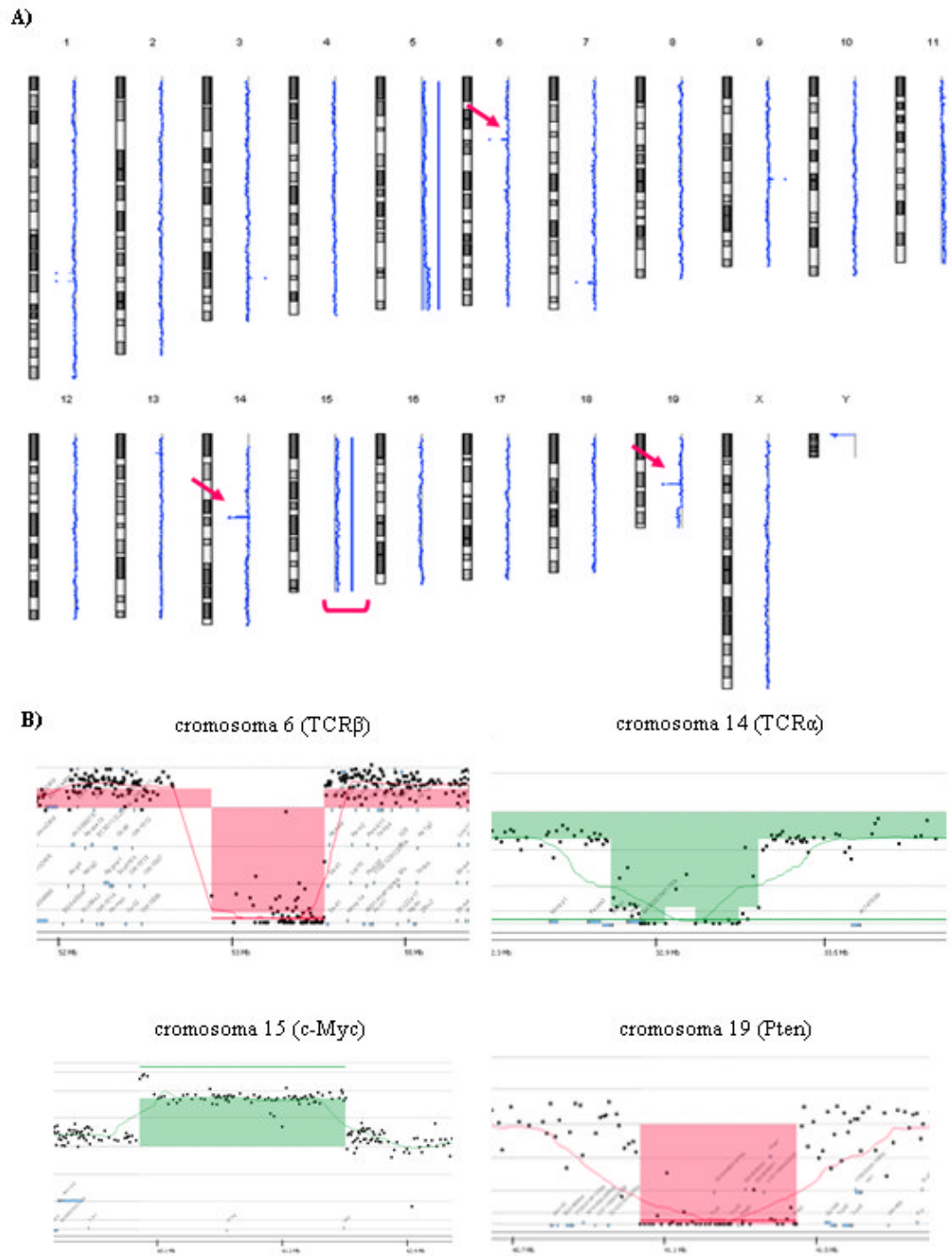


Figura 28. Caracterización de los linfomas mediante aCGH. A) Cariotipo molecular de un linfoma de timo deficiente en p53. Las alteraciones frecuentes se señalan con una flecha o una llave. Se aprecian las deleciones de los locus TCR α y β en los cromosomas 6 y 14, la triploidía del cromosoma 15 y la deleción del locus de Pten en el cromosoma 19. **B)** Imágenes representativas de dichas alteraciones frecuentes de manera individual.

Todas las alteraciones frecuentes en los linfomas $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ están presentes también en los $p53^{-/-}$. Sin embargo, el número de alteraciones por tumor es inferior en los $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ (tabla 8), lo que muestra que los linfomas $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ son menos inestables que los $p53^{-/-}$.

genotipo	$\mu^{+/+}p53^{-/-}$	$\mu^{-/-}p53^{-/-}$
n (linfomas)	8	12
alteraciones en el número de copia (promedio/tumor)	11,8	6,8

Tabla 8. Cuantificación de las alteraciones en el número de copia en los linfomas $p53^{-/-}$ y $\mu^{-/-}p53^{-/-}$. Se exponen los valores promedio del número de alteraciones en cada uno de los tumores.

El conjunto de los datos sugiere que la reducción en la supervivencia media que muestran los ratones $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ en comparación con los $p53^{-/-}$ no es debida a un efecto negativo sobre la linfomagénesis. Probablemente, la ausencia de pol μ reduzca la longevidad de los ratones $p53^{-/-}$ como consecuencia del incremento en la incidencia de sarcomas.

Discusión

Las células de mamífero soportan entre 10.000 y 100.000 mutaciones y/o lesiones diarias en su genoma (Ames, Shigenaga et al. 1993). De todos los tipos de lesiones posibles, las roturas de doble banda (DSBs) son las lesiones más perjudiciales; un solo evento de DSB no reparado puede condenar a la célula a sufrir apoptosis o iniciar un proceso de inestabilidad genética. Las DSBs son principalmente reparadas por los mecanismos de recombinación homóloga (HR) y la ligación de extremos no homólogos (NHEJ), siendo esta última la ruta mayoritaria.

El mecanismo de reparación de NHEJ requiere la actuación de un conjunto de proteínas esenciales (*reparosoma*) tales como KU70/80, DNA-PKcs, LIGIV, XRCC4 y Cernunos/XLF. También forman parte del sistema (proteínas accesorias), en función del tipo de DSB, factores como Artemis, la DNA polimerasa λ y la DNA polimerasa μ . Hasta nuestro último trabajo (Lucas, Escudero et al. 2009), el único requerimiento *in vivo* descrito de la DNA polimerasa μ era en el reordenamiento de la cadena ligera κ de las inmunoglobulinas (Bertocci, De Smet et al. 2002; Bertocci, De Smet et al. 2003; Lucas, Lain de Lera et al. 2005; Bertocci, De Smet et al. 2006).

En este estudio, investigamos la importancia de la DNA polimerasa μ en la reparación del DNA en células primarias (ampliando el radio de búsqueda a condiciones de estrés celular), estudiamos el envejecimiento de los ratones $\mu^{-/-}$ y analizamos la deficiencia en pol μ en un entorno deficiente en p53.

DEFICIENCIA EN POL μ Y SENSIBILIDAD A ESTRÉS GENOTÓXICO:

La delección o inactivación de cualquiera de los factores principales de NHEJ induce una marcada sensibilidad a la radiación ionizante y a otros agentes que provocan DSBs, así como defectos en la recombinación V(D)J (Bassing and Alt 2004; Meek, Gupta et al. 2004; Meek, Dang et al. 2008). La delección de pol μ conlleva defectos en el desarrollo de los linfocitos B (Bertocci, De Smet et al. 2003; Lucas, Lain de Lera et al. 2005). Además, según los estudios realizados en este laboratorio, la deficiencia en esta polimerasa genera una reducción significativa en prácticamente todos los linajes hematopoyéticos y sensibilidad a estrés genotóxico, tanto en el sistema hematopoyético como en células y tejidos no hematopoyéticos, lo que demuestra que la DNA polimerasa μ juega un papel en la reparación global en DSBs (Lucas, Escudero et al. 2009).

Sensibilidad a radiación ionizante:

Los ratones deficientes en pol μ muestran hipersensibilidad a radiación γ : tras una dosis de 9 Gy, mueren todos en 15 días, cuando aún sobrevive el 40% de los controles (Lucas, Escudero et al. 2009). Esto sugeriría un defecto en la reparación global de DSBs provocadas por irradiación, así que decidimos abordar el estudio mediante el análisis de la estabilidad cromosómica y los niveles de γ H₂AX.

1) Los experimentos de FISH con sondas teloméricas y el estudio de las translocaciones involucrando el cromosoma 6 han mostrado que las células de médula ósea $\mu^{-/-}$ son hipersensibles a la radiación γ , pero no presentan inestabilidad genética significativa cuando no se les somete a irradiación. Esto sugiere que pol μ sólo es necesaria para el correcto funcionamiento de NHEJ cuando existe un nivel de daño importante

(equiparable al producido por la radiación ionizante), al menos en células de la médula ósea.

La hipersensibilidad de la médula ósea $\mu^{-/-}$ a la radiación γ también se pone de manifiesto *in vivo*: tras irradiar a los animales, las células de médula ósea mostraron mayor inestabilidad cromosómica en ausencia de pol μ .

2) Las células de bazo procedentes de ratones $\mu^{-/-}$ también muestran niveles de DSBs más elevados tras la irradiación, como indican los datos obtenidos mediante inmunocitoquímica y *Western Blot* de $\gamma\text{H}_2\text{AX}$, sin observarse diferencias en condiciones basales. Sin embargo, los cultivos de médula ósea mostraron un mayor nivel de DSBs en las células $\mu^{-/-}$ también en condiciones basales (incremento que, según apuntan los resultados de FISH que acabamos de comentar, parece no ser suficiente como para generar mayor inestabilidad cromosómica). Esto sugiere que, en la médula ósea, el requerimiento de pol μ es mayor que en el bazo, lo cual concuerda con el patrón de expresión de esta polimerasa (mayoritario en médula ósea, timo y centroblastos).

3) Los MEFs $\mu^{-/-}$ son hipersensibles a la radiación ionizante (Lucas, Escudero et al. 2009), al igual que ocurre en los MEFs deficientes en los factores principales de NHEJ (Bassing and Alt 2004; Meek, Gupta et al. 2004; Meek, Dang et al. 2008). Bertocci y cols., en un trabajo anterior al nuestro, describen que la deficiencia en pol μ no confiere a los MEFs una mayor sensibilidad a la radiación ionizante (Bertocci, De Smet et al. 2006). Sin embargo, Chayot y cols. (Chayot, Danckaert et al. 2010), en un estudio publicado recientemente, confirman la hipersensibilidad de los MEFs $\mu^{-/-}$ a la radiación γ utilizando la línea de ratones obtenida por Bertocci y cols. (Bertocci, De Smet et al. 2006). Las condiciones experimentales, especialmente diferentes entre el estudio de Bertocci y los dos posteriores (el nuestro y el de Chayot y cols.), pueden haber influido en la diferencia obtenida en los resultados.

4) La deficiencia en pol μ también confiere hipersensibilidad a radiación γ *in vivo* en hígado, como indican los niveles de $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ obtenidos después de haber irradiado a los animales, superiores en el hígado procedente de los ratones $\mu^{-/-}$.

El conjunto de los experimentos confirmó que la deficiencia en pol μ provoca hipersensibilidad a la radiación γ en el sistema hematopoyético y en células (MEFs) y tejidos (hígado) no hematopoyéticos, *in vitro* e *in vivo*. Esto sugiere el requerimiento de pol μ en la reparación global de DSBs en condiciones de estrés genotóxico. Además, los datos muestran que pol μ puede ser necesaria en condiciones basales, como ocurre en las células de médula ósea, donde la expresión fisiológica de pol μ es más elevada. Este órgano es el encargado de generar las células madre de todo el sistema hematopoyético y de abastecer a los órganos linfoides secundarios para que los precursores terminen de diferenciarse a los diversos linajes. Por ello, parece lógico pensar que la velocidad de reparación y la eficacia de NHEJ, ambas disminuidas en ausencia de pol μ , sean factores más críticos para la médula ósea que para el resto de los sistemas estudiados.

Sensibilidad a estrés oxidativo:

Los MEFs de ratones deficientes en muchas de las proteínas involucradas en reparación del DNA muestran senescencia prematura ((de Boer and Hoeijmakers 2000; Celeste, Petersen et al. 2002); revisado en (Hasty, Campisi et al. 2003)). Nuestros resultados demuestran que los MEFs $\mu^{-/-}$ entran prematuramente en senescencia, lo cual se pone de

manifiesto a diferentes niveles: 1) capacidad replicativa (ensayo 3T3, en el que los MEFs $\mu^{-/-}$ dejan de proliferar antes que los wt), 2) expresión de marcadores de senescencia y estrés celular (*Western Blot*, indicando sobreexpresión de p19 y p21) y 3) tamaño celular aumentado (FACS). Descartamos una contribución significativa de procesos apoptóticos a la dinámica de crecimiento de los MEFs $\mu^{-/-}$, pues: 1) los niveles de BAX (proteína inducida por p53 y efector en la apoptosis ([Chong, Murray et al. 2000](#); [Vousden and Lu 2002](#); [Ihrie and Attardi 2004](#))) no son significativamente superiores y 2) los datos de ciclo celular no muestran una mayor proporción de apoptosis en los MEFs deficientes en pol μ .

El conjunto de los experimentos indica que dicha entrada prematura en senescencia es consecuencia de estrés oxidativo generado por el cultivo, pues esta crisis proliferativa desaparece (en ambos genotipos) en condiciones de oxígeno más similares a las fisiológicas (5% O_2). Además, los MEFs $\mu^{-/-}$ muestran un incremento de acumulación de peróxidos y de inestabilidad cromosómica al 20% O_2 que se reduce al 5% O_2 . Los MEFs $\mu^{-/-}$ también albergan un mayor contenido mitocondrial, lo cual puede ser consecuencia de su tamaño celular (superior al de los MEFs wt). Una explicación alternativa es que el mayor contenido mitocondrial sea consecuencia de una sobreactivación de la biogénesis de mitocondrial causada por el defecto bioenergético que da lugar al aumento de peróxidos ([Samper, Morgado et al. 2009](#)).

Nuestros resultados van de la mano con los de Parrinello y cols., que comprobaron que los MEFs cultivados en un 3% de O_2 no presentaban signos de senescencia y que el crecimiento seguía siendo exponencial durante más de sesenta duplicaciones celulares ([Parrinello, Samper et al. 2003](#)). Asimismo, estos autores demostraron que el fenotipo de senescencia prematura de MEFs deficientes en DNA-PKcs y Ku80 era parcialmente rescatado al cultivar las células en 3% O_2 ([Parrinello, Samper et al. 2003](#)).

Bertocci y cols. no observan diferencias significativas en la capacidad proliferativa de los MEFs $\mu^{-/-}$ en comparación con los wt ([Bertocci, De Smet et al. 2006](#)), mientras que los resultados de Chayot y cols. muestran una senescencia más acusada, aunque no prematura ([Chayot, Danckaert et al.](#)). Creemos que la discrepancia se puede deber a la interacción de 3 factores:

1) *Densidad de siembra*, pues es clave en la proliferación celular ([Gradl, Faust et al. 1995](#); [Nakatsuji and Miller 1998](#)). La densidad a la que se han sembrado los MEFs coincide en los 2 estudios que observan senescencia incrementada en los MEFs $\mu^{-/-}$ ([Chayot, Danckaert et al.](#) ; [Lucas, Escudero et al. 2009](#)), pero es la mitad en el que no se encuentran diferencias ([Bertocci, De Smet et al. 2006](#)). De acuerdo con esta hipótesis, Chayot y cols. observan que los defectos proliferativos de los MEFs $\mu^{-/-}$ en condiciones de estrés disminuyen a medida que lo hace la velocidad de proliferación en cultivo ([Chayot, Danckaert et al.](#)).

2) *Fondo genético*, BalbC/129sv en nuestro laboratorio ([Lucas, Escudero et al. 2009](#)) y C57BL6/129sv en los otros dos casos ([Chayot, Danckaert et al.](#) ; [Bertocci, De Smet et al. 2006](#) 2010). Chayot y cols. comparten esta opinión.

3) *Estrategia de generación del knockout*. En nuestro modelo, se eliminó el dominio BRCT (exones 2-4), mientras que en el de Bertocci y cols. se eliminó el centro catalítico (exones 6-11) de la polimerasa. Además, nuestro grupo ha demostrado la inexistencia de la proteína truncada mediante *Western Blot* ([Lucas, Lain de Lera et al. 2005](#)), pero no hay datos publicados sobre la expresión proteica en el otro modelo.

El conjunto de los datos indica que los MEFs $\mu^{-/-}$ entran prematuramente en senescencia como consecuencia de la respuesta al estrés genotóxico y de la inestabilidad cromosómica que estas células adquieren en las condiciones habituales de cultivo.

IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE POL μ EN LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.

Los niveles de entrecruzamientos entre cromátidas hermanas (SCE) han sido ampliamente utilizados como indicador de la actividad de recombinación homóloga pues, aunque las bases moleculares de dicho mecanismo no han sido completamente elucidadas, los estudios indican que los entrecruzamientos son un producto de la recombinación homóloga cuando se generan DSBs en una horquilla de replicación ((Sonoda, Sasaki et al. 1999), revisado en (Wilson and Thompson 2007)).

El incremento en la tasa de formación de SCE es típico de los ratones deficientes en proteínas de reparación de roturas de una sola hebra, como PARP1 (Orsburn, Escudero et al. ; Yang, Cortes et al. 2004) o XRCC1 (Thompson, Brookman et al. 1990). Esto se debe a que estos entrecruzamientos proceden de una SSB que, al bloquear la horquilla de replicación, genera una DSB (Cromie and Leach 2000; Helleday 2003; Andreassen, Ho et al. 2006; Wilson and Thompson 2007). Por otro lado, las células de ratones deficientes en factores de HR muestran un descenso de los entrecruzamientos (revisado en (Wilson and Thompson 2007)). En cuanto a las modificaciones de la tasa de SCE en células deficientes en NHEJ, los trabajos más destacados de resumen en la tabla D1.

Estudio	Modelo (especie)	Deficiencia	Tasa de HDR	Tasa de SCE
Pierce, Hu et al. 2001 (1)	Células madre embrionarias (humano)	Ku70 ^{-/-} DNA-PKcs ^{-/-} Xrcc4 ^{-/-}	Incremento	No variación
Li, Ouyang et al. 1998 (2)	MEFs (ratón)	Ku70 ^{-/-}	(No descrito)	Incremento
Sonoda, Sasaki et al. 1999 (3)	Línea celular (linfocitos B) DT40* (pollo)	Ku70 ^{-/-}	(No descrito)	No variación

Tabla D1. Variación de los niveles de SCE (y HDR (del inglés, *Homologous Directed Recombination*)) en células deficientes en NHEJ. (1) Tasa de HDR inducidos por la endonucleasa I-SceI en el locus hprtDRGFP y tasa de SCE en células deficientes en 3 factores de NHEJ. (2) y (3) Tasa de SCE en células Ku70^{-/-}. (*) Elevada tasa de HR, que podría estar enmascarando el efecto de Ku70.

Teniendo en cuenta la bibliografía existente, estos datos podrían implicar tres ideas no excluyentes:

- 1) *SCE es dependiente de tipo celular.* En nuestro modelo, observamos incremento en los niveles de SCE en MEFs, células Ramos y CHO deficientes en la función de pol μ , pero no en linfocitos B $\mu^{-/-}$.
- 2) *SCE es dependiente de la magnitud del daño.* Los entrecruzamientos son producto de un error en el proceso de HR. Por tanto, lo más probable es que SCE se incremente de forma apreciable a partir de un cierto umbral de daño. Ello podría explicar su aumento en ausencia de pol μ en las líneas celulares Ramos y CHO y en MEFs, y no en linfocitos, en los que el ensayo se inicia el día en el que estas células se ponen en

cultivo. Además, las condiciones de cultivo podrían estar contribuyendo a las diferencias mostradas, pues el medio de cultivo de los linfocitos, a diferencia de los restantes casos, lleva un potente antioxidante (β -mercaptoetanol).

3) *Los niveles de SCE se ven afectados por la activación de los mecanismos de NHEJ alternativos.* Si las DSBs se originan con anterioridad a la replicación celular, la puesta en marcha de mecanismos alternativos de NHEJ (B-NHEJ) podría explicar que no aumente SCE en células deficientes en los factores principales NHEJ (Pierce et al., 2001). Sin embargo, pol μ no es una proteína vital en la reparación, por lo que su ausencia podría no ser suficiente como para activar los mecanismos B-NHEJ y las DSBs llegan a la horquilla sin ser reparadas, originando un aumento de SCE.

Nosotros proponemos que la ausencia o disminución de la actividad de la DNA polimerasa μ disminuye la eficiencia y la velocidad de reparación de NHEJ, lo que deja al descubierto un mayor número de DSBs. La célula responde intentando solventar el daño, para lo que activa los procesos de recombinación homóloga por encima de los niveles basales. En este caso, los mecanismos alternativos de NHEJ se verían inhibidos por 2 motivos: 1) la subordinación de estos mecanismos a HR (Rockwood, Nussenzweig et al. 2003; Busuttil, Munoz et al. 2008) y 2) la suficiente eficacia de NHEJ como para no requerirlos.

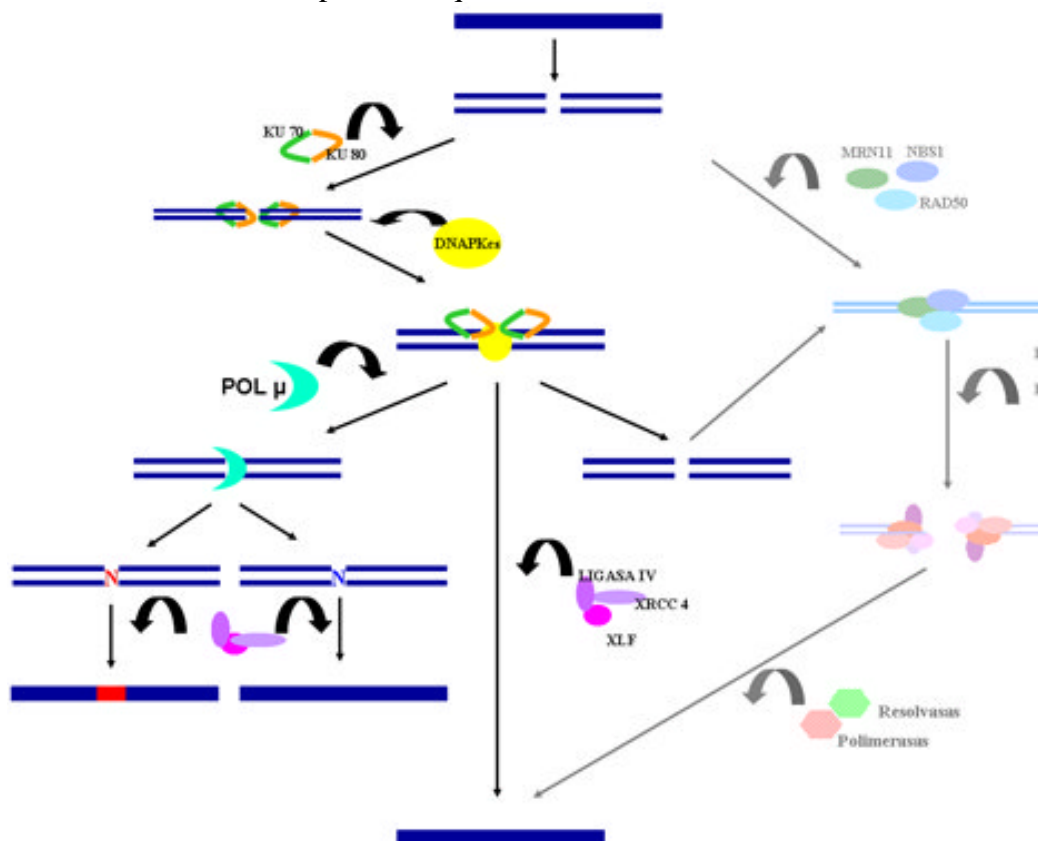


Figura D1. Reparación en presencia y en ausencia de pol μ en condiciones basales. Las DSBs pueden ser reparadas por los dos mecanismos principales. Sin embargo, la vía predominante es NHEJ (excepto en G2M). Este mecanismo, además, es más rápido, pues no utiliza grandes regiones de homología para la reparación. En presencia de pol μ , las DSBs son reparadas eficientemente (N), pero, en muchos casos, se introducen mutaciones (N). En ausencia de pol μ , la introducción de mutaciones disminuye, pero quedan más roturas sin reparar y el proceso de NHEJ es más lento, permitiendo así que algunas roturas sean reparadas mediante HR. Los mecanismos de control de ciclo celular se encargan de eliminar, si procede, las células con roturas remanentes que tampoco HR haya podido reparar. Por tanto, en ausencia de pol μ , la reparación es más fiel.

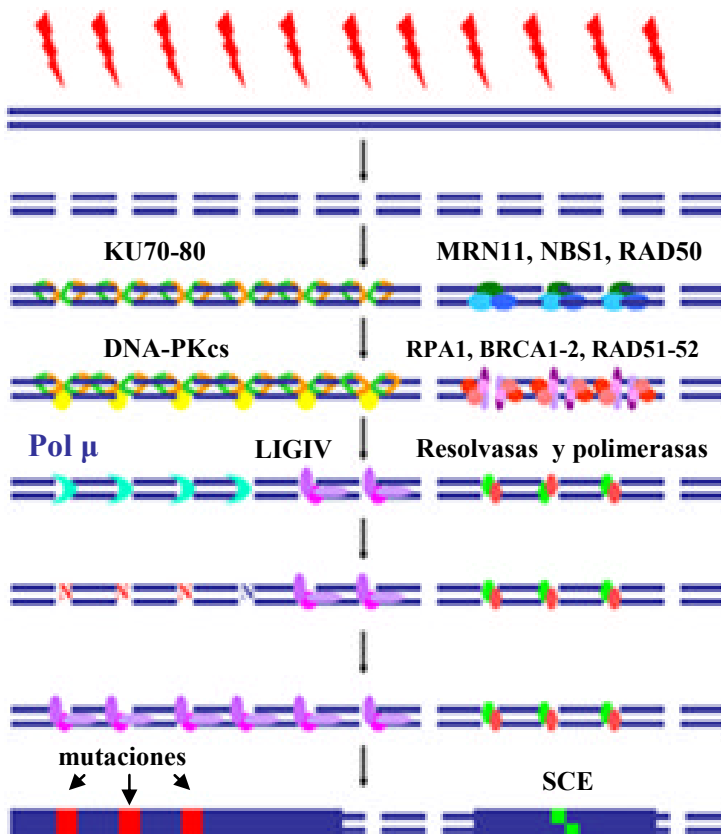


Figura D2. Reparación en presencia y en ausencia de pol μ en condiciones de estrés genotóxico. Ante un daño elevado, habrá un mayor número de DSBs que NHEJ no abarque, especialmente, en ausencia de pol μ . La baja tasa de error producido por HR se hace más evidente en estas condiciones, de manera que se apreciará un incremento en SCE. De la magnitud del daño y de los requerimientos específicos del tipo celular dependerá la contribución de HR a la reparación y el incremento de SCE observado.

ENVEJECIMIENTO EN EL RATÓN $\mu^{-/-}$:

Los ratones $\mu^{-/-}$ muestran un retraso en el envejecimiento, dependiendo de fondo genético (significativo en fondo Balbc/129sv y no significativo en C57BL/6). Es la primera vez que se describe que la deficiencia en un sistema de reparación de DNA pueda conllevar una extensión de la longevidad (Escudero B et al., artículo enviado). No todos los modelos deficientes en sistemas de reparación muestran alteraciones en el envejecimiento, pero, si se describe efecto alguno, es de envejecimiento prematuro. Los ratones deficientes en la mayoría de los factores de reparación de la vía NER muestran una aceleración en el proceso de envejecimiento (de Boer, Andressoo et al. 2002; Niedernhofer, Garinis et al. 2006; Garinis 2008). Otros ejemplos son la deficiencia en Ku80 y en DNA-PKcs (Vogel, Lim et al. 1999; Espejel, Martin et al. 2004).

La longevidad media del ratón $\mu^{-/-}$ se incrementa aproximadamente un 25% respecto al control wt. Este dato nos llevó a profundizar sobre la función de pol μ en la reparación de DSBs en el envejecimiento. Al inicio de esta Tesis Doctoral, ya habíamos observado en el ratón $\mu^{-/-}$ una serie de características fenotípicas que correlacionan con un menor grado de envejecimiento: mayor espesor de la capa de grasa subcutánea (Trifunovic, Wredenberg et al. 2004), menor tamaño, preservación de los cocientes de células CD4/CD8 en sangre periférica y médula ósea (Lucas, Lain de Lera et al. 2005), y menor deterioro de la función cerebral (capacidad cognitiva y de aprendizaje) (Lucas, Delgado-García, Escudero et al., 2011, artículo en revisión). En este trabajo, profundizamos en el estudio del envejecimiento en el ratón $\mu^{-/-}$.

Los *arrays* de expresión génica realizados en hígados de ratones wt y $\mu^{-/-}$ viejos sugieren que la modulación de los procesos de apoptosis podría estar contribuyendo al incremento

en la longevidad de los ratones $\mu^{-/-}$. El hígado de los ratones $\mu^{-/-}$ viejos mostró una regulación a la baja de genes de vías apoptóticas y/o inducibles por P53 (Bid, p21, Perp, Egl3, Acin1 y Ddit4l), cuya activación provoca apoptosis ante un daño en el DNA que supere un cierto umbral. La activación de P53 puede conducir a la célula a senescencia, si aún puede ser reparada, como medida de protección ante la transformación celular (revisado en (Campisi 2005; Finkel, Serrano et al. 2007)). De hecho, P21 no induce apoptosis, sino parada de ciclo celular. Sin embargo, el ratón $\mu^{-/-}$ no presenta una mayor propensión a sufrir cáncer espontáneo, ni inducido (Escudero et al., 2011, artículo en preparación), lo que sugiere que la disminución de los niveles de P21 es consecuencia de un menor daño celular.

La disminución en la tasa de apoptosis mostrada por los *arrays* de expresión fue confirmada mediante RT-PCR cuantitativa y el ensayo de *túnel*, en el que se observó una reducción notable de células apoptóticas en los hígados de ratones viejos $\mu^{-/-}$ respecto a los wt. Por tanto, los datos sugieren que la disminución de los procesos de apoptosis en el tejido hepático contribuye al retraso en el envejecimiento mostrado por los ratones $\mu^{-/-}$.

Otro dato que contribuye al mantenimiento de un hígado más joven en los ratones $\mu^{-/-}$ es el menor grado de poliploidía. El hígado es un órgano que contiene células poliplodes ya en la juventud, pero el grado de poliploidía aumenta con el envejecimiento y en condiciones de estrés genotóxico (revisado en (Storchova and Pellman 2004); (Gupta 2000; Funk-Keenan, Haire et al. 2008)), estando asociado a inestabilidad genómica y/o deterioro en la funcionalidad del órgano (revisado en (Storchova and Pellman 2004)).

Un ejemplo contrario a este fenotipo es el del ratón deficiente en *Ercc1* (factor de reparación del DNA mediante NER (Houtsmuller, Rademakers et al. 1999; de Boer and Hoeijmakers 2000; Zhu, Niedernhofer et al. 2003)), que presenta envejecimiento prematuro y muestra incrementado el grado de poliploidía en hígado (Selfridge, Hsia et al. 2001; Chipchase, O'Neill et al. 2003; Kirschner, Singh et al. 2007). La explicación más probable es que la deficiencia en *Ercc1* genera un defecto acusado en la reparación del DNA, promoviendo inestabilidad genómica, mientras que la deficiencia en *pol μ* tiene un efecto más leve (por ser una proteína accesoria, no principal, en NHEJ) e implica un mecanismo de NHEJ menos mutagénico cuya menor eficiencia podría, además, estar siendo compensada por una mayor activación de HR, mecanismo más fiel. En consecuencia, se alcanzaría un menor grado de inestabilidad genómica con el paso del tiempo, lo cual contribuye a retrasar el envejecimiento.

El deterioro de la función cerebral (habilidades cognitivas y de aprendizaje) es más lento en los ratones $\mu^{-/-}$ que en los wt (Lucas, Delgado-García, Escudero et al., 2011, artículo en revisión). Por ello, analizamos la expresión de genes involucrados en procesos cuya evolución (regulación a la baja) ha sido descrita en el envejecimiento cerebral fisiológico: apoptosis, inflamación y transporte mitocondrial (Prolla 2002; Krabbe, Pedersen et al. 2004; Zahn, Sonu et al. 2006). Observamos una acusada regulación a la baja de *Egl3*, inductor de apoptosis neuronal (Lipscomb, Sarmiere et al. 1999; Lipscomb, Sarmiere et al. 2001; Straub, Lipscomb et al. 2003; Lee, Nakamura et al. 2005). También pudimos apreciar disminución en los niveles de BID, efector de apoptosis y diana de P53 (Luo, Budihardjo et al. 1998; Desagher, Osen-Sand et al. 1999; Wei, Lindsten et al. 2000; Deng, Ren et al. 2003). Sin embargo, los demás genes analizados involucrados en apoptosis o inducibles por P53 mostraron niveles similares a los del control wt. En cuanto a los genes involucrados en inflamación (de los cuales analizamos *C1qa*, *C3a*, *C5a*, *C5l2* y *Gfap*), sólo encontramos un gen, *C1qa* (componente

del sistema de complemento), significativamente regulado a la baja. Los genes involucrados en el transporte electrónico (de los cuales analizamos Mrpl12, Timm17a, Ndufa10, Atp5a) no mostraron diferencias significativas en su expresión.

Proponemos que el cerebro envejece más lentamente porque NHEJ es menos mutagénica, y también menos eficiente, lo que provoca una respuesta celular de compensación mediante la sobreactivación de HR. El sumatorio de NHEJ introduciendo menos mutaciones y de una mayor contribución de HR, dan como resultado una mayor estabilidad del genoma. La inestabilidad genómica y la inducción de los procesos apoptóticos son dos factores asociados al envejecimiento. Sin embargo, en el caso del cerebro, a diferencia del hígado, puede que la inhibición de los procesos de apoptosis constituya sólo una contribución minoritaria al mantenimiento de un órgano más joven.

La preservación del cociente de linfocitos T CD4/CD8 en y timo habría la posibilidad de que también en el sistema linfohematopoyético se ralentizase el envejecimiento en ausencia de pol μ :

1) Pese a que la tasa de aberraciones cromosómicas de la médula ósea no se ve afectada por la ausencia de pol μ en ratones jóvenes, el análisis de aneuploidías y translocaciones de los cromosomas 1, 2 y 3 de ratones viejos mostró un ligero aumento de inestabilidad cromosómica en el caso de los ratones $\mu^{-/-}$. Esto podría ser debido a que, en un organismo envejecido (más estresado que uno joven), HR no es capaz de compensar suficientemente la disminución en la eficiencia de NHEJ debida a la ausencia de pol μ . Como consecuencia, se genera una mayor tasa de aberraciones cromosómicas, aunque haya, probablemente, menos mutaciones en ausencia de pol μ .

2) El daño oxidativo como causa del deterioro celular constituye una de las teorías más aceptadas sobre el envejecimiento (Beckman and Ames 1998). El timo y el bazo de los ratones $\mu^{-/-}$ mostraron una disminución en el de peróxidos durante el envejecimiento. Los niveles de estos radicales libres en el ratón $\mu^{-/-}$ joven son, sin embargo, similares a los del wt, lo que sugiere dos alternativas: 1) que un factor contribuyente a la mayor longevidad de los ratones $\mu^{-/-}$ es la menor acumulación de ROS con el paso del tiempo o 2) que dicha acumulación reducida es consecuencia de una mejor funcionalidad bioenergética y/o metabólica.

El conjunto de los datos sugiere que el sistema linfohematopoyético contribuye, aunque parcialmente, al fenotipo de envejecimiento retardado del ratón $\mu^{-/-}$.

EFFECTO DEL FONDO GENÉTICO EN LA FUNCIÓN DE POL μ .

El ratón deficiente en pol μ generado inicialmente en nuestro laboratorio se hizo en una cepa híbrida Balbc x 129sv. Rederivamos el ratón $\mu^{-/-}$ a un fondo C57BL/6 con objeto de generar la línea pol μ :p53, pues el ratón p53 $^{-/-}$ del que partimos estaba en dicho fondo genético (ver materiales y métodos). Fue durante nuestra investigación con dicha línea cuando observamos que el efecto de la deficiencia de pol μ se atenúa en este fondo genético.

➤ Se sigue manteniendo el fenotipo principal de ratón $\mu^{-/-}$ (su defecto en el desarrollo de los linfocitos B).

➤ El fenotipo de los MEFs no se mantiene, aunque siguen una proliferación ligeramente enlentecida. Los tres trabajos que hay con MEFs llegan a conclusiones

diferentes sobre el efecto de pol μ . Las condiciones experimentales, la estrategia de generación del modelo *knockout* y el fondo genético pueden estar contribuyendo a las discrepancias. Sin embargo, es evidente que el fondo genético es la variable de más peso, pues ha sido el único factor modificado en nuestro laboratorio y los resultados no han sido los mismos.

➤ El estudio de la supervivencia de la colonia en fondo C57BL/6 muestra una tendencia del ratón $\mu^{-/-}$ a ser más longevo (la vida media del ratón es un 11% superior a la del control $\mu^{-/-}$), pero la diferencia con el control wt no es estadísticamente significativa.

Cada cepa tiene alelos únicos que constituyen su fondo genético y que pueden interaccionar y modificar la expresión de una mutación o de un transgen. De hecho, son numerosos los casos en los que el que el fondo genético (y/o el ambiente) modifica el fenotipo de un *knockout*, entre los que cabe destacar ejemplos como los de los modelos murinos Ku70^{-/-} (revisado en (Li, Vogel et al. 2007)) y Brca1^{Tr/Tr} (Ludwig, Fisher et al. 2001).

Por tanto, teniendo en cuenta los resultados de nuestro trabajo, la bibliografía referente a la DNA polimerasa μ y los argumentos expuestos hasta el momento en esta discusión, podemos concluir que **la deficiencia en pol μ afecta a la reparación de DSBs (tanto en el sistema linfohematopoyético como en células no hematopoyéticas) y al envejecimiento, aunque la magnitud del efecto es dependiente del fondo genético.**

EFFECTO GLOBAL DE LA AUSENCIA DE LA DNA POLIMERASA μ .

Un modelo en el que se combinan las propiedades bioquímicas de pol μ , su función no esencial en NHEJ y la conocida competición existente entre las dos vías principales de reparación de DSBs a lo largo del ciclo celular (Takata, Sasaki et al. 1998; Haber 1998; Chen, Silver et al. 1999; Kim, Krasieva et al. 2005), explica el efecto que genera la deficiencia de pol μ : **de forma global y con diferente penetrancia en distintos tejidos, la ausencia de pol μ puede provocar una reparación menos eficaz pero más fiel.** Basándonos en esta hipótesis, podemos argumentar las 3 aportaciones que este trabajo ha proporcionado a cerca del fenotipo del ratón $\mu^{-/-}$:

1) **La DNA polimerasa μ tiene una función en la reparación global de DSBs**, al contrario de lo que se había demostrado hasta el momento. La necesidad de variabilidad en la respuesta antigénica hace que la ausencia de una polimerasa proclive a error, como es pol μ , conlleve un defecto en el reordenamiento de los segmentos génicos de las inmunoglobulinas pero, probablemente debido a que su función puede ser parcialmente adoptada por otras polimerasas (como pol λ o TdT) (Nick McElhinny, Havener et al. 2005; Moon, García-Díaz et al. 2007), su deficiencia no impide el desarrollo de los linfocitos. En el caso de DSBs no generadas de manera programada, ya sea en el sistema hematopoyético (médula ósea, linfocitos B) o en otros tipos celulares (MEFs, tejido hepático), las consecuencias difieren en función del contexto celular, pero se pueden resumir como sigue:

En condiciones basales, NHEJ es eficaz sin pol μ , por lo que se mantiene la integridad genómica del organismo. Pol λ , menos proclive a error que pol μ , podrá resolver parte de las roturas; y HR, mecanismo más fiel que NHEJ, se activará por encima de los niveles basales para compensar el defecto si es necesario, pues la reparación es más lenta en

ausencia de pol μ (permitiendo una mayor contribución de HR). En condiciones de estrés genotóxico, el daño generado es demasiado como para ser abarcado por NHEJ sin pol μ . HR se activará igualmente, pero, como resultado de un incremento en el número de DSBs, su mayor contribución podría dar lugar a un aumento de SCE. El incremento de entrecruzamientos entre cromátidas hermanas y las roturas no reparadas por ninguna de las dos vías resultan, finalmente, en inestabilidad genética.

2) La ausencia de pol μ aumenta la longevidad. Hemos demostrado que la deficiencia en pol μ provoca un retraso en el envejecimiento. De hecho, son muchos los modelos deficientes en reparación que exhiben envejecimiento prematuro, como puede ser el caso de la deficiencia en Ku o DNA-PKcs. Nosotros proponemos que, al contrario de lo que cabría esperar, la ausencia de pol μ no genera, *in vivo*, mayor daño genético, sino lo contrario. Debido a que se trata de una proteína proclive a error, es lógico pensar que la deficiencia en pol μ conlleve una menor acumulación de mutaciones durante el envejecimiento. El reemplazamiento parcial por parte de pol λ y una mayor contribución de HR permiten que el genoma se mantenga más estable. Sin embargo, también habrá roturas no reparadas por NHEJ que HR no pueda solventar. En dicho caso, los mecanismos de control del ciclo llevarán a las células aberrantes a senescencia o apoptosis, manteniendo la homeostasis tisular. Nuestra hipótesis, además, se ve secundada por los trabajos de Rockwood y de Busuttil ([Rockwood, Nussenzweig et al. 2003](#); [Busuttil, Munoz et al. 2008](#)), en los que se demuestra que la deficiencia en Ku80, *in vivo*, disminuye la tasa de mutaciones somáticas y de reordenamientos cromosómicos, lo cual es debido a que HR interviene para compensar el defecto de NHEJ.

La consecuencia de esta cooperación entre los dos sistemas es específica de tejido. En hígado viejo, órgano en el que hemos demostrado una mayor preservación de la estabilidad cromosómica en ausencia de pol μ , los procesos de apoptosis están disminuidos, lo cual es acorde a un retraso en el envejecimiento. Sin embargo, la inhibición de las vías apoptóticas no parece contribuir significativamente al mantenimiento de una función cerebral más joven, como ocurre en ausencia de pol μ . Por otro lado, en el sistema linfóide, la ausencia de pol μ está asociada a una disminución de los niveles de radicales libres, lo cual puede contribuir al retraso del envejecimiento o ser una consecuencia de un sistema más joven, con una mejor funcionalidad bioenergética y/o metabólica. En el caso de células madre, donde el mantenimiento de la estabilidad genómica es crítico, la mínima deficiencia que la ausencia de pol μ pueda conllevar en NHEJ hará que, en muchos casos, las células sufran apoptosis en lugar de intentar ser reparadas por HR (que también puede cometer errores). Esto conllevaría un menor tamaño de la población de células precursoras, que, sin embargo, mantienen la integridad genómica. Esto explicaría la reducción que los ratones muestran en la mayoría de los linajes linfoides, y también el menor tamaño que muestran los ratones $\mu^{-/-}$.

3) Estamos ante un modelo murino cuya deficiencia ($\mu^{-/-}$) provoca efecto negativo a nivel celular *-in vitro-* pero efecto positivo, a largo plazo, a nivel de tejido/organismo.

El ejemplo más representativo lo encontramos en el tejido conjuntivo, que constituye parte de la piel y del que se derivan los MEFs. En el ratón $\mu^{-/-}$, los MEFs muestran senescencia prematura; sin embargo, su piel es más joven. La explicación puede estar en la magnitud del daño. Si nos referimos a las DSBs, el daño cutáneo que los ratones sufren en su día a día se debe a lesiones espontáneas debido a los ROS producidos por el metabolismo y a lesiones inducidas por las nucleasas celulares. Sin embargo, los MEFs en cultivo, además de sufrir estas mismas lesiones, están expuestos a una presión de O_2 muy superior a la fisiológica, por lo que el estrés será de mayor magnitud. De hecho, el fenotipo de los

MEFs deficientes en pol μ prácticamente desaparece en una atmósfera reducida en O_2 . Por tanto, tenemos dos situaciones muy diferentes: 1) la de la piel, con un daño basal que puede ser reparado por NHEJ sin pol μ y 2) la de los MEFs, cuyo daño es demasiado como para que NHEJ pueda afrontarlo eficientemente en ausencia de pol μ . Esto explicaría por qué el ratón $\mu^{-/-}$, criado en condiciones SPF, no presenta peores condiciones fisiológicas que un ratón wt. El hecho de que, además, se mantenga más joven habría que atribuirlo, de nuevo, a una mayor preservación de la estabilidad genómica y puede que a una menor activación de procesos de senescencia y/o apoptosis.

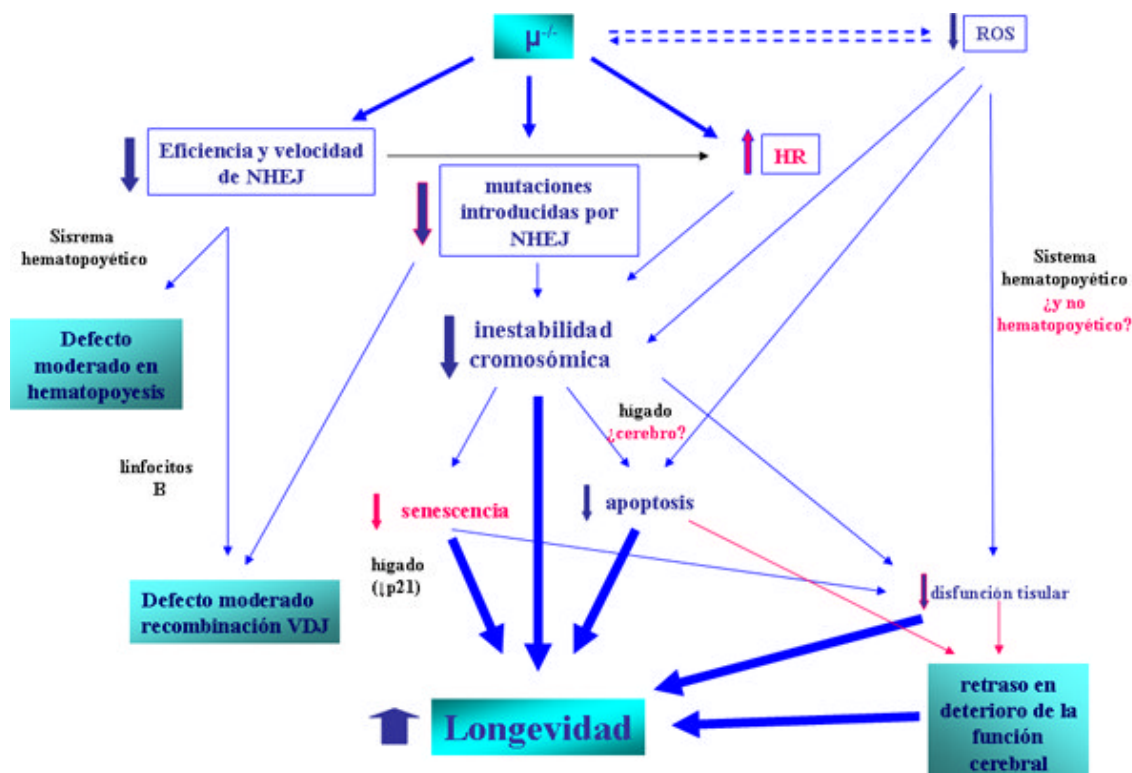


Figura D3. Efecto de la deficiencia de la DNA polimerasa μ in vivo. El color rosa refleja los puntos pendientes de estudio. En el caso de las mutaciones introducidas por NHEJ, hay evidencias *in vitro*, pero no *in vivo*. El incremento de HR también encuentra apoyo en los datos *in vitro*, pero es necesario un estudio *in vivo*.

En resumen, el trabajo realizado en el ratón $\mu^{-/-}$ pone de manifiesto un fenotipo sin precedentes. Además de demostrarse una función de pol μ en la reparación global *in vivo* (y no sólo en la recombinación V(D)J), la deficiencia de esta proteína de reparación provoca una extensión en la longevidad debido, probablemente, al reajuste del equilibrio HR-NHEJ en la célula y a que la reparación mediante NHEJ es menos mutagénica en ausencia de pol μ .

COOPERACIÓN ENTRE POL μ Y P53.

Durante esta Tesis nos propusimos estudiar la posible interacción genética entre la polimerasa μ y p53, pues el fondo genético $p53^{-/-}$ es permisivo a los procesos de apoptosis y la falta de función de ambos genes podría poner de manifiesto el papel de pol μ en la reparación de DNA *in vivo*.

El ratón $p53^{-/-}$ ha sido caracterizado tanto durante el desarrollo embrionario (Armstrong, Kaufman et al. 1995; Sah, Attardi et al. 1995) como en la etapa postnatal (Donehower, Harvey et al. 1992; Jacks, Remington et al. 1994). La ausencia de p53 en el embrión está asociada a exencefalia, uno de los tipos más comunes de defectos en el tubo neural (NTDs). Tras el nacimiento, el fenotipo que caracteriza al ratón $p53^{-/-}$ es el desarrollo de tumores (mayoritariamente linfomas de células T), lo que le provoca la muerte hacia los 6 meses de edad (Donehower, Harvey et al. 1992; Jacks, Remington et al. 1994).

Existen varios factores de reparación del DNA sobre los que se ha descrito una interacción funcional con p53 durante el desarrollo embrionario, entre los que se encuentran la DNA Ligasa IV y Xrcc4: la deficiencia en estos factores de NHEJ es letal debido a una apoptosis neuronal masiva, pero la delección simultánea de p53 en los embriones permite la viabilidad de estos embriones (Frank, Sharpless et al. 2000; Gao, Ferguson et al. 2000). Teniendo en cuenta, además, que pol μ interviene en la desarrollo de los linfocitos durante las primeras fases de la formación del embrión (Gozalbo-Lopez, Andrade et al. 2009), nos propusimos estudiar cómo afecta la ausencia de la DNA polimerasa μ al desarrollo de los embriones $p53^{-/-}$. Los resultados indican que ni la incidencia de exencefalia ni la viabilidad de estos embriones se ve afectada por la deficiencia en pol μ . Esto sugiere que la DNA polimerasa μ no juega un papel importante en la reparación global de DSBs durante el desarrollo embrionario y que, en la fase prenatal, su función puede estar limitada al sistema linfocitario.

Los modelos murinos deficientes simultáneamente en sistemas de reparación de DNA y p53 constituyen una buena aproximación para el estudio de cómo la célula se desenvuelve ante un daño en el DNA cuando fallan los mecanismos de control. Los ratones deficientes en Ku o DNA-PKcs son inmunodeficientes como consecuencia de defectos en la recombinación VDJ (Gu, Seidl et al. 1997; Gao, Chaudhuri et al. 1998). Sin embargo, la delección de p53 en estos ratones permite la supervivencia de los linfocitos genéticamente aberrantes (Frank, Sharpless et al. 2000; Gao, Ferguson et al. 2000; Zhu, Mills et al. 2002), lo que explica que los ratones $Ku^{-/-}p53^{-/-}$ y $DNA-PKcs^{-/-}p53^{-/-}$ desarrollen linfomas con mayor incidencia que los $p53^{-/-}$ (Nacht, Strasser et al. 1996; Lim, Vogel et al. 2000). Una de las consecuencias de este fenómeno es que los ratones deficientes en NHEJ y p53 presentan una reducción de la longevidad comparado con los ratones $p53^{-/-}$. Los ratones $ligIV^{-/-}p53^{-/-}$ o $Xrcc4^{-/-}p53^{-/-}$ también mueren antes que los $p53^{-/-}$ y desarrollan linfomas pro-B (Frank, Sharpless et al. 2000; Gao, Ferguson et al. 2000).

Pol μ se expresa principalmente en los órganos linfoides y se ha demostrado su intervención *in vivo* en el desarrollo de los linfocitos B. El ratón $\mu^{-/-}$ no muestra tendencia al desarrollo de tumores, pero, por analogía con los factores principales de NHEJ (y considerando su patrón de expresión y función *in vivo*), cabía esperar que el ratón $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ mostrase una elevada propensión al desarrollo de linfomas, lo que le ocasionaría una muerte prematura. Nuestro estudio muestra que los ratones $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ viven un 25% menos que los $p53^{-/-}$, aunque, sorprendentemente, la incidencia de linfomas es inferior en los ratones deficientes en pol μ y p53.

Caracterización los linfomas en los ratones $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ y p53 $^{-/-}$.

El análisis por citometría de flujo confirma la presencia de linfocitos T dobles positivos en los linfomas de timo $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ y p53 $^{-/-}$. Además, hemos observado una población que hemos denominado *población BT* por expresar marcadores de linaje B y de linaje T simultáneamente (población B220 $^{+}$ CD8 $^{+}$). Esta población está presente en una proporción importante de linfomas analizados (32%), independientemente de su localización y genotipo. **Estos resultados sugieren alteraciones en las vías de señalización que promueven la diferenciación de las células madre a lo linajes B o T.** Esto podría deberse a una translocación, delección o amplificación en un *locus* (o *loci*) esencial(es) para la diferenciación a uno de los dos linajes linfoides. Esta hipótesis se ve apoyada por los estudios de Tokoro y cols. (Sagara, Sugaya et al. 1997; Tokoro, Sugawara et al. 1998). Estos investigadores observaron que, en el timo de los ratones transgénicos que sobreexpresan CD3 ϵ humano (tg ϵ 26), se forman células B (B220 $^{+}$) que expresan transcritos específicos de células T y que esta alteración tenía su origen ya en los precursores el hígado fetal. Los autores proponen que este fenotipo puede ser debido a la inserción del transgén en un *locus* crucial en la diferenciación celular a una de las dos ramas linfoides.

Resultados previos de citometría de flujo han mostrado la presencia de células B220 $^{+}$ en los linfomas de timo de los ratones p53 $^{-/-}$ (Jacks, Remington et al. 1994; Lim, Vogel et al. 2000). Los autores lo atribuyen a una población B dentro del timo, pero no especifican si han estudiado la posibilidad de que dicho marcador se encuentre en también en las células T. Por tanto, puede que la población BT no aparezca sólo en nuestra colonia, caso en el cual podríamos pensar que este fenotipo es debido a una interacción entre p53 y el fondo genético C57BL/6.

También se ha observado una elevada proporción de células B en timo, médula ósea, bazo y nódulos linfoides de los ratones Ku80 $^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ (Lim, Vogel et al. 2000) y LigIV $^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ (Frank, Sharpless et al. 2000). Se trata de linfomas pro-B, pues la población dominante es CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$ B220 $^{+}$ CD43 med y CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$ B220 $^{+}$ CD43 $^{+}$, respectivamente (patrón de expresión acorde con un estado inmaduro de célula pro-B). En los linfomas de timo de los ratones $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$, no hemos observado una proporción elevada de células B220 $^{+}$ que no sean las células BT.

La comparación de nuestros datos con los de las publicaciones existentes indica que la linfomagénesis en los ratones $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ muestra una gran diferencia respecto a los NHEJ $^{-/-}$ p53 $^{-/-}$: éstos desarrollan principalmente linfomas pro-B, mientras que los $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ desarrollan linfomas T/BT. Sería necesario analizar la expresión de CD43 (pues el único marcador de células B analizado ha sido B220) para comprobar si los ratones $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ presentan, además, linfomas pro-B. Sin embargo, como exponemos a continuación, la caracterización genómica de los linfomas no sugiere desarrollo de linfomas pro-B en los ratones $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$.

El análisis mediante aCGH de los linfomas de los ratones $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ y p53 $^{-/-}$ reveló una serie de alteraciones genómicas comunes a los dos genotipos (que se resumen en la tabla D2):

localización	genotipo	tumores	amplificación cromosoma 15 (c-Myc)	delección C1 cromosoma 19 (Pten)	delección B1 cromosoma 6 (TCR β)	delección C2 cromosoma 14 (TCR α)
TIMO	$\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$	4	1 (25%)	4 (100%)	2 (50%)	2 (50%)
	$\mu^{+/+}$ p53 $^{-/-}$	8	4 (50%)	5 (62,5%)	8 (100%)	8 (100%)
BAZO	$\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$	3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	$\mu^{+/+}$ p53 $^{-/-}$	4	2 (50%)	0 (0%)	1 (25%)	3 (75%)

Tabla D2. Cuantificación de las aberraciones frecuentes localizadas en los linfomas (de bazo y timo) de los ratones p53 $^{-/-}$ y $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$. Se representa el número de tumores (y, entre paréntesis, el porcentaje de los mismos) en el que se ha encontrado cada una de las aberraciones frecuentes.

1) La amplificación del cromosoma 15 se presenta de forma recurrente (50%) en los linfomas p53 $^{-/-}$, no siendo tan acusada en los linfomas $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ (12,5%).

Los linfomas de Burkitt (humanos) se caracterizan por albergar la translocación de c-Myc (que, en humanos, se encuentra en el cromosoma 8) a un *locus* de inmunoglobulina (Ig), ya sea IgH (translocación (8;14)) o IgL (translocación (8;14) para la cadena ligera λ y translocación (2;8) para la cadena ligera k) (Brady, Macarthur et al. 2008). Los linfomas pro-B desarrollados por los ratones NHEJ $^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ se consideran homólogos a los linfomas de Burkitt y se caracterizan por la translocación del locus IgH al de c-Myc, (translocación (12;15)) y la amplificación de este último o de ambos *loci* (Vanasse, Concannon et al. 1999; Difilippantonio, Zhu et al. 2000; Frank, Sharpless et al. 2000; Gao, Ferguson et al. 2000; Lim, Vogel et al. 2000; Zhu, Mills et al. 2002) . El mecanismo se inicia con una DSB introducida por RAG en el *locus* IgH (recombinación V(D)J) que no puede ser reparada en células NHEJ $^{-/-}$ p53 $^{-/-}$. El defecto que el ratón $\mu^{-/-}$ tienen en la recombinación VDJ se da en el reordenamiento de la cadena ligera (*locus* IgL) (Bertocci, De Smet et al. 2003; Lucas, Lain de Lera et al. 2005), pero no se ha observado que el reordenamiento de la cadena pesada (*locus* IgH) esté afectado, lo cual es una posible explicación al hecho de que no se haya observado (de forma frecuente) una amplificación de c-Myc en los ratones $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$. Este hecho sugiere que los ratones $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ no tienen tendencia a desarrollar linfomas pro-B. Sería necesario el empleo de técnicas de *painting* cromosómico con sondas contra los cromosomas 15 (c-Myc), 12 (*locus* IgH) y 6 (*locus* IgL) para comprobar que no tienen lugar eventos de translocación entre los *loci* de las inmunoglobulinas y c-Myc.

2) En los linfomas de timo de nuestra colonia, los *loci* de las cadenas α y β , que componen el TCR de los linfocitos T maduros (revisado en (Petrie and Zuniga-Pflucker 2007)), aparecen delecionadas.

Frank y cols. (Frank, Sharpless et al. 2000) postulan que la delección de p53 no rescata sustancialmente el defecto de recombinación V(D)J en los timocitos LigIV $^{-/-}$, cuyo estadio de máxima maduración es el doble negativo, donde TRC β no se expresa (revisado en (Petrie and Zuniga-Pflucker 2007)). Por el contrario, los timocitos $\mu^{-/-}$ alcanzan el estadio de simples positivos (que implica la expresión del TCR completo), lo que sugiere que las delecciones de TCR α y TCR β son exclusivamente debidas a la ausencia de p53 $^{-/-}$ (pues los linfomas también muestran estas alteraciones). Esto explicaría que p53 no pueda rescatar el fenotipo de los timocitos LigIV $^{-/-}$.

De los 6 linfomas en los que observamos la población BT por citometría de flujo, 4 pertenecen al grupo de los tumores hibridados en los *arrays* de CGH. Esta técnica reveló, en la totalidad de los casos, la delección simultánea de las cadenas α y β del TCR, por lo que parece existir una fuerte asociación entre la delección del TCR y la aparición de células BT en los linfomas deficientes en p53 (independientemente de la ausencia o presencia de pol μ). Teniendo en cuenta que lo más probable es que el evento que destina a la célula a ser BT se produzca en la médula ósea, proponemos lo siguiente:

La delección de p53 genera una alteración en una región genómica clave para la decisión de la célula madre entre los linajes B o T. Esta célula alterada migra al timo, donde se produce la delección del TCR β y del TCR α , probablemente, como consecuencia de la primera alteración.

3) Pten interviene en la homeostasis y la señalización de los linfocitos T (Teng, Hu et al. 1997; Suzuki, Yamaguchi et al. 2001). Ejerce su función de supresión tumoral antagonizando vías que promueven proliferación e inhiben apoptosis (Manning and Cantley 2007), interviniendo en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica (Shen, Balajee et al. 2007) y cooperando directamente en las respuestas mediadas por p53 (Li, Piluso et al. 2006). Pten está delecionado en un elevado porcentaje de los tumores de timo analizados, lo que sugiere que dicho evento contribuye de forma importante a la transformación de los timocitos deficientes en p53. Entre los linfomas de timo de nuestra colonia que presentan amplificación de c-Myc, un elevado porcentaje (60%) muestra también la delección de Pten. **Los datos sugieren que existe una cooperación entre p53 y Pten en la supresión de tumores de timo y que, a su vez, la amplificación de c-Myc se ve promovida por la delección de Pten**, hipótesis apoyada por dos hechos: 1) Pten y p53 actúan coordinadamente regulando los niveles de proteína de c-Myc en las células madre neurales (Zheng, Ying et al. 2008) y 2) los ratones Pten^{-/-} desarrollan linfomas que se originan en el timo caracterizados por la sobreexpresión de c-Myc (Liu, Karnell et al.).

Nuestros resultados difieren parcialmente de los obtenidos por Venkatachalam y cols. (Venkatachalam, Shi et al. 1998). Al igual que nosotros, este grupo encuentra de forma frecuente la amplificación de c-Myc en los linfomas p53^{-/-}. Sin embargo, no observan las delecciones de Pten, TCR α y TCR β . El fondo genético de los ratones empleados por este grupo (C57BL/6x129sv) difiere del nuestro (C57BL/6). Además, la tecnología empleada en dicho caso es menos sensible que la nuestra, con una resolución unas 10 veces menor: ellos emplean un aCGH de 3000 BACs y nosotros empleamos unos aCGHs de última generación de 180.000 sondas de oligonucleótidos 60 mer. Por tanto, el fondo genético y la técnica empleada podrían estar contribuyendo a la discrepancia entre los dos estudios.

El conjunto de los datos obtenidos mediante los *arrays* de CGH sugiere la cooperación de al menos tres mecanismos de alteración en el número de copia que interactúan con la delección de p53 en los procesos de transformación tumoral: 1) amplificación del oncogen c-Myc, 2) delección de las regiones cromosómicas que contienen las cadenas α y/o del β del TCR y 3) delección del supresor de tumores Pten. Asimismo, estos datos sugieren 2 reflexiones acerca del efecto de la ausencia de pol μ en los linfomas p53^{-/-}:

1) Las alteraciones frecuentes que presentan los linfomas $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ son consecuencia de la delección de p53 pero no de pol μ , pues estas alteraciones se presentan independientemente de la ausencia de pol μ en los linfomas $p53^{-/-}$. La única excepción podría ser la delección de Pten, pero el número de linfomas $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ analizado es demasiado pequeño para tal afirmación.

2) Los linfomas $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ parecen ser menos inestables que los $p53^{-/-}$, ya que el número de alteraciones (totales) por tumor es inferior en los $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ (tabla 7 de resultados). Es posible que pol μ esté siendo sustituida por polimerasas que introduzcan menos errores (como pol λ (Nick McElhinny, Havener et al. 2005)), lográndose así una reparación más fiel aunque menos eficiente. De esta forma, el número de mutaciones acumuladas por los linfomas $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ sería menor que el de las acumuladas en los $p53^{-/-}$, lo que disminuiría la probabilidad de aberraciones.

Efecto de la deficiencia de pol μ en el desarrollo de sarcomas en los ratones $p53^{-/-}$: datos *in vitro* (MEFs) e *in vivo* (tumores).

Los MEFs constituyen una aproximación *in vitro* para el estudio del tejido conjuntivo (por su origen común en el mesodermo), del que se derivan los sarcomas.

En un fondo C57BL/6, los MEFs $\mu^{-/-}$ no muestran mayor inestabilidad cromosómica que los wt en las condiciones habituales de cultivo, lo que sugiere que el estrés oxidativo no es suficiente requerimiento para la necesidad de pol μ en este fondo genético. Sin embargo, los MEFs $\mu^{-/-}p53^{-/-}$, al igual que lo que ocurre en los MEFs NHEJ $^{-/-}p53^{-/-}$ (Karanjawala, Grawunder et al. 1999), mostraron mayor inestabilidad cromosómica que los $p53^{-/-}$. Tal hecho podría ser debido a que la delección de p53 aumenta la capacidad proliferativa de los MEFs en cultivo (Frank, Sharpless et al. 2000; Gao, Ferguson et al. 2000; Lim, Vogel et al. 2000), lo que, como ya se ha demostrado previamente (Chayot, Danckaert et al. ; Lucas, Escudero et al. 2009), hace que el efecto de la ausencia de pol μ sea más acusado.

Los MEFs NHEJ $^{-/-}p53^{-/-}$ se muestran más sensibles a estrés genotóxico que los $p53^{-/-}$. La ausencia de pol μ , a diferencia de la de los principales factores de NHEJ, no ha mostrado efecto alguno sobre la resistencia a la radiación γ o al estrés oxidativo de los MEFs $p53^{-/-}$. La explicación más probable es que el efecto de la ausencia de pol μ en los MEFs, menos drástico que el de los principales factores de NHEJ y atenuado en este fondo genético, se ve enmascarado por el potente efecto de la delección de p53.

In vivo, la ausencia de pol μ tiene un acusado efecto en el tejido conjuntivo, pues aumenta de forma significativa la incidencia de sarcomas en los ratones $p53^{-/-}$. Esto demuestra que pol μ interviene en la reparación global de DSBs, con un papel de mayor importancia en el tejido conjuntivo que en el sistema linfóide en un entorno deficiente en p53. De hecho, proponemos que la causa de que los ratones $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ presenten una menor longevidad que los $p53^{-/-}$ es que la ausencia de DNA polimerasa μ afecta preferentemente al tejido conjuntivo en estos ratones, lo que trae como consecuencia que el ratio linfomas/sarcomas disminuya considerablemente en los ratones $\mu^{-/-}p53^{-/-}$ respecto a los $p53^{-/-}$. De los ratones que han desarrollado tumores visibles, un 82% de los ratones $p53^{-/-}$ desarrolló linfomas y el 18% restante mostraba sarcomas y linfomas o tumores mixtos (linfoma/sarcoma). Sin embargo, en los ratones $\mu^{-/-}p53^{-/-}$, detectamos un 55% de linfomas frente a un 40% de sarcomas y un 5% con ambos tipos de tumor. Pese a que no podemos hablar de valor

estadístico debido al tamaño de muestra (especialmente en los ratones $p53^{-/-}$), parece evidente que μ muestra una interacción sinérgica con $p53$ en sistemas no linfoides. Un aspecto pendiente es el estudio genómico de los sarcomas en estos ratones, en busca de mecanismos moleculares que ayuden a explicar la cooperación entre μ y $p53$ en el tejido conjuntivo que, sin embargo, no se da en el sistema linfoide.

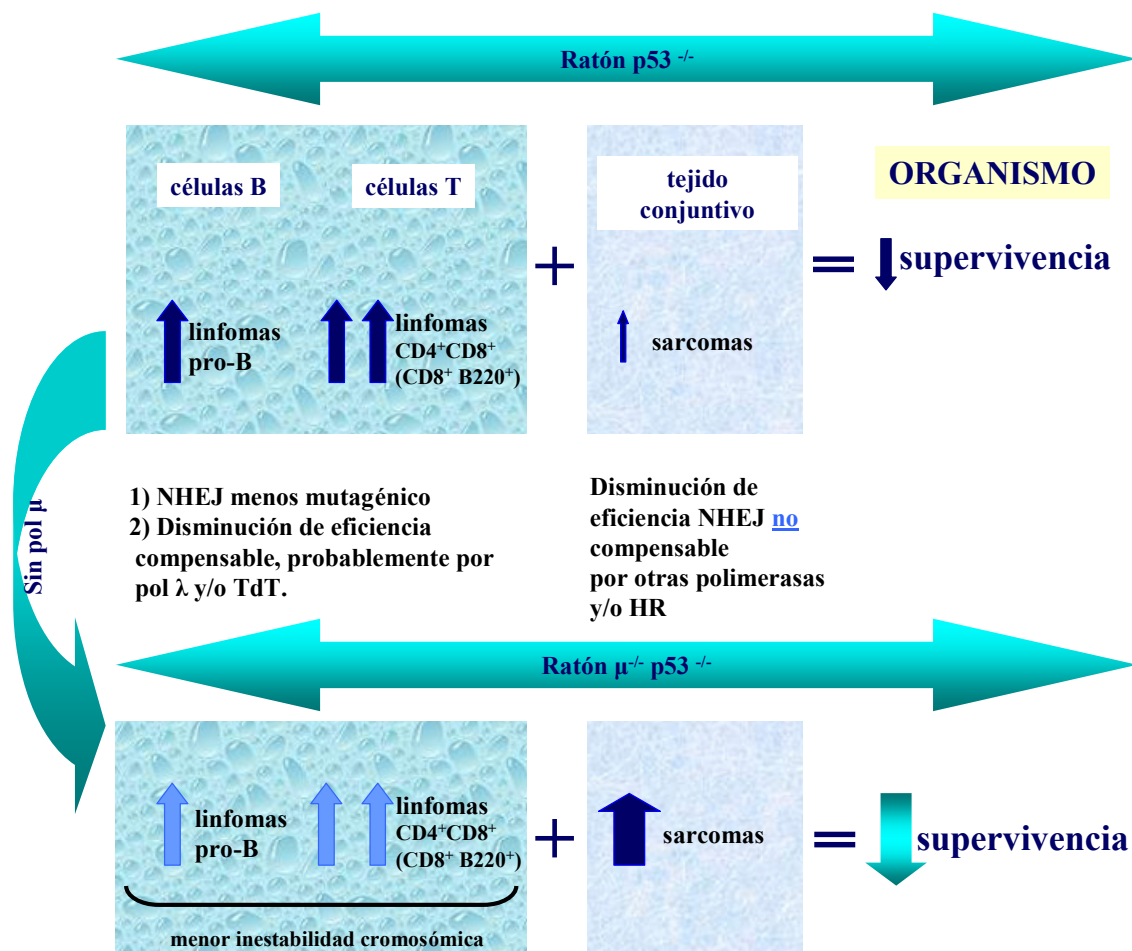


Figura D4. Efecto de la ausencia de μ *in vivo* en un entorno deficiente en $p53$.

VISIÓN GLOBAL.

La deficiencia en la DNA polimerasa μ tiene un efecto paradójico en el organismo, que parece estar mediado por un balance entre un mecanismo de NHEJ menos eficiente, pero menos mutagénico, y la reparación por HR, más fiel. μ es necesaria para superar condiciones de estrés genotóxico, pero no para el mantenimiento de la integridad del genoma durante el envejecimiento. De hecho, el ratón $\mu^{-/-}$ muestra un aumento de la longevidad, pero, en un ambiente de estrés celular como el que supone la ausencia del supresor de tumores $p53$, el animal ve reducida su supervivencia. Este efecto paradójico pone de manifiesto la relevancia de μ *in vivo*, también en sistemas no hematopoyéticos:

1) El efecto de la deficiencia de μ en hígado y cerebro (y en el sistema linfoide) contribuye al retraso en el envejecimiento mostrado por ratón $\mu^{-/-}$.

2) En ausencia de p53, la ausencia de pol μ en el sistema linfoide es compensable por otras polimerasas (probablemente, pol λ) y/o HR. Ambas opciones contribuyen a una reparación más fiel, lo que favorece que los linfomas $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ sean menos inestables que los p53 $^{-/-}$. Sin embargo, el efecto que la deficiencia en pol μ genera en el tejido conjuntivo no puede ser compensada por otras polimerasas o por HR, como refleja el incremento en la incidencia de sarcomas que tienen los ratones $\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$ en comparación con los p53 $^{-/-}$. Este efecto hace que la ausencia de pol μ provoque una reducción en la supervivencia de los ratones deficientes en p53.

Conclusiones

- 1) La deficiencia en la actividad pol μ provoca hipersensibilidad a la radiación γ tanto *in vitro* como *in vivo*, afectando tanto a tejidos hematopoyéticos como no hematopoyéticos.** Esto sugiere un papel relevante para pol μ en la reparación general de DSBs en condiciones de estrés genotóxico.
- 2) Los fibroblastos embrionarios (MEFs) deficientes en pol μ entran prematuramente en senescencia como consecuencia de la inestabilidad cromosómica y alteraciones en los niveles de P19^{ARF} que estas células presentan en condiciones de estrés oxidativo.**
- 3) La deficiencia en pol μ provoca incremento moderado en SCE (*Sister Chromatid Exchange*), dependiente del tipo celular,** lo que sugiere una contribución de la vía de HR (*Homologous Recombination*) por encima de los niveles basales para compensar la disminución en la eficiencia y en la velocidad de reparación de NHEJ (*Non Homologous End Joining*).
- 4) Los ratones deficientes en pol μ presentan una longevidad aumentada, probablemente contribuida por varios de los factores identificados (conclusiones 4-6). El hígado presenta una clara disminución del conjunto de los procesos apoptóticos y una disminución de su poliploidía,** probablemente como consecuencia de una menor acumulación de mutaciones en las células $\mu^{-/-}$ en comparación con los controles. Un análisis de expresión diferencial permitió confirmar este envejecimiento ralentizado del hígado en términos moleculares.
- 5) El sistema linfohematopoyético de los ratones deficientes en pol μ muestra una menor acumulación de ROS durante el envejecimiento.**
- 6) El cerebro de los ratones deficientes en pol μ muestra una disminución sustancial de dos genes implicados en procesos apoptóticos (Egln3 y Bid) y de un gen del sistema de complemento (C1qa), pero presenta niveles similares a los del control en los demás genes involucrados en el envejecimiento cerebral que se han analizado.** Es probable que la inhibición de determinados procesos apoptóticos, en cooperación con un aumento de la estabilidad del genoma debida a la participación de vías menos mutagénicas en los procesos de reparación, contribuyan al mantenimiento de la función cerebral más joven mostrada por los ratones deficientes en pol μ .
- 7) La deficiencia en pol μ provoca un efecto paradójico: negativo a nivel celular *-in vitro-* pero positivo, a largo plazo, a nivel de tejido/organismo.** Esto es probablemente debido a que la ausencia de pol μ : 1) disminuye la eficacia de NHEJ, lo que promueve inestabilidad cromosómica en condiciones de estrés genotóxico, y 2) fuerza la participación de vías menos eficaces pero menos mutagénicas, probablemente con un mayor concurso de HR en la reparación de DSBs, promoviendo una menor acumulación de mutaciones con el paso del tiempo, contribuyendo así a mantener al organismo más joven.
- 8) Los animales $\mu^{-/-}$ p53^{-/-} presentan una incidencia inferior de linfomas, que además son menos inestables que los p53^{-/-}.** El proceso de linfomagénesis en los ratones $\mu^{-/-}$ p53^{-/-} es muy similar al descrito en ratones p53^{-/-}. Los linfomas de los ratones $\mu^{-/-}$ p53^{-/-} y p53^{-/-} muestran delecciones (Pten, TCR) y amplificaciones (c-Myc) clonales y recurrentes, sugiriendo que los genes codificados en dichos locus cooperan con p53 en el proceso de linfomagénesis.

9) La deficiencia en pol μ aumenta la incidencia de sarcomas en los ratones p53^{-/-}, reduciendo su supervivencia, lo que demuestra que pol μ interviene *in vivo* en la reparación de DSBs en el tejido conjuntivo.

Bibliografía

- Abad, J. L., F. Serrano, et al. (2002). "Single-step, multiple retroviral transduction of human T cells." *J Gene Med* **4**(1): 27-37.
- Agrawal, A. and D. G. Schatz (1997). "RAG1 and RAG2 form a stable postcleavage synaptic complex with DNA containing signal ends in V(D)J recombination." *Cell* **89**(1): 43-53.
- Ahn, J., M. V. Poyurovsky, et al. (2009). "Dissection of the sequence-specific DNA binding and exonuclease activities reveals a superactive yet apoptotically impaired mutant p53 protein." *Cell Cycle* **8**(10): 1603-15.
- Ahn, J. Y., X. Li, et al. (2002). "Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain." *J Biol Chem* **277**(22): 19389-95.
- Ahnesorg, P., P. Smith, et al. (2006). "XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining." *Cell* **124**(2): 301-13.
- Allday, M. J. (2009). "How does Epstein-Barr virus (EBV) complement the activation of Myc in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma?" *Semin Cancer Biol* **19**(6): 366-76.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis." *Environ Health Perspect* **101 Suppl 5**: 35-44.
- Anderson, C. W. and T. H. Carter (1996). "The DNA-activated protein kinase -- DNA-PK." *Curr Top Microbiol Immunol* **217**: 91-111.
- Anderson, R. M., D. Shanmuganayagam, et al. (2009). "Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys." *Toxicol Pathol* **37**(1): 47-51.
- Andrade, P., M. J. Martin, et al. (2009). "Limited terminal transferase in human DNA polymerase mu defines the required balance between accuracy and efficiency in NHEJ." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(38): 16203-8.
- Andreassen, P. R., G. P. Ho, et al. (2006). "DNA damage responses and their many interactions with the replication fork." *Carcinogenesis* **27**(5): 883-92.
- Aoufouchi, S., E. Flatter, et al. (2000). "Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family." *Nucleic Acids Res* **28**(18): 3684-93.
- Appella, E. and C. W. Anderson (2001). "Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses." *Eur J Biochem* **268**(10): 2764-72.
- Armstrong, J. F., M. H. Kaufman, et al. (1995). "High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice." *Curr Biol* **5**(8): 931-6.
- Audebert, M., B. Salles, et al. (2004). "Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining." *J Biol Chem* **279**(53): 55117-26.
- Bakhanashvili, M. (2001). "Exonucleolytic proofreading by p53 protein." *Eur J Biochem* **268**(7): 2047-54.
- Bakhanashvili, M. (2001). "p53 enhances the fidelity of DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase." *Oncogene* **20**(52): 7635-44.
- Bakhanashvili, M., R. Gedelovich, et al. (2008). "Exonucleolytic degradation of RNA by p53 protein in cytoplasm." *J Mol Med* **86**(1): 75-88.
- Bakhanashvili, M., E. Novitsky, et al. (2004). "P53 in cytoplasm may enhance the accuracy of DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase." *Oncogene* **23**(41): 6890-9.
- Barak, Y., T. Juven, et al. (1993). "mdm2 expression is induced by wild type p53 activity." *EMBO J* **12**(2): 461-8.

- Barnes, D. E. and T. Lindahl (2004). "Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells." *Annu Rev Genet* **38**: 445-76.
- Bassing, C. H. and F. W. Alt (2004). "The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks." *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 781-96.
- Bassing, C. H., K. F. Chua, et al. (2002). "Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 8173-8.
- Bassing, C. H., W. Swat, et al. (2002). "The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination." *Cell* **109 Suppl**: S45-55.
- Bates, S., E. S. Hickman, et al. (1999). "Reversal of p53-induced cell-cycle arrest." *Mol Carcinog* **24**(1): 7-14.
- Bates, S., A. C. Phillips, et al. (1998). "p14ARF links the tumour suppressors RB and p53." *Nature* **395**(6698): 124-5.
- Bates, S. and K. H. Vousden (1999). "Mechanisms of p53-mediated apoptosis." *Cell Mol Life Sci* **55**(1): 28-37.
- Bebenek, K. and T. A. Kunkel (2004). "Functions of DNA polymerases." *Adv Protein Chem* **69**: 137-65.
- Beckman, K. B. and B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." *Physiol Rev* **78**(2): 547-81.
- Ben-Porath, I. and R. A. Weinberg (2005). "The signals and pathways activating cellular senescence." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(5): 961-76.
- Bertocci, B., A. De Smet, et al. (2003). "Immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu." *Immunity* **19**(2): 203-11.
- Bertocci, B., A. De Smet, et al. (2002). "Cutting edge: DNA polymerases mu and lambda are dispensable for Ig gene hypermutation." *J Immunol* **168**(8): 3702-6.
- Bertocci, B., A. De Smet, et al. (2006). "Nonoverlapping functions of DNA polymerases mu, lambda, and terminal deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination in vivo." *Immunity* **25**(1): 31-41.
- Besmer, E., P. Gourzi, et al. (2004). "The regulation of somatic hypermutation." *Curr Opin Immunol* **16**(2): 241-5.
- Bischoff, F. Z., S. O. Yim, et al. (1990). "Spontaneous abnormalities in normal fibroblasts from patients with Li-Fraumeni cancer syndrome: aneuploidy and immortalization." *Cancer Res* **50**(24): 7979-84.
- Blasco, M. A. (2007). "Telomere length, stem cells and aging." *Nat Chem Biol* **3**(10): 640-9.
- Blasco, M. A., W. Funk, et al. (1995). "Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA." *Science* **269**(5228): 1267-70.
- Boboila, C., M. Jankovic, et al. "Alternative end-joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(7): 3034-9.
- Boboila, C., C. Yan, et al. "Alternative end-joining catalyzes class switch recombination in the absence of both Ku70 and DNA ligase 4." *J Exp Med* **207**(2): 417-27.
- Bollum, F. J., L. M. Chang, et al. (1974). "Nucleotide polymerizing enzymes from calf thymus gland." *Methods Enzymol* **29**(0): 70-81.
- Bond, S. L. and S. M. Singh (1987). "Methyl nitrosourea induced unscheduled DNA synthesis in vivo in mice. Effects of background genotype on excision repair during aging." *Mech Ageing Dev* **41**(3): 177-87.

- Bothmer, A., D. F. Robbiani, et al. "53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination." *J Exp Med* **207**(4): 855-65.
- Bouevitch, O., A. Lewis, et al. (1993). "Probing membrane potential with nonlinear optics." *Biophys J* **65**(2): 672-9.
- Bouffler, S. D., C. J. Kemp, et al. (1995). "Spontaneous and ionizing radiation-induced chromosomal abnormalities in p53-deficient mice." *Cancer Res* **55**(17): 3883-9.
- Bowman, P. D., R. L. Meek, et al. (1975). "Aging of human fibroblasts in vitro. Correlations between DNA synthetic ability and cell size." *Exp Cell Res* **93**(1): 184-90.
- Brady, G., G. J. Macarthur, et al. (2008). "Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma." *Postgrad Med J* **84**(993): 372-7.
- Brenner, S. and C. Milstein (1966). "Origin of antibody variation." *Nature* **211**(5046): 242-3.
- Brown, E. J. and D. Baltimore (2000). "ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality." *Genes Dev* **14**(4): 397-402.
- Brown, E. J. and D. Baltimore (2003). "Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance." *Genes Dev* **17**(5): 615-28.
- Bruick, R. K. and S. L. McKnight (2001). "A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF." *Science* **294**(5545): 1337-40.
- Buck, D., L. Malivert, et al. (2006). "Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly." *Cell* **124**(2): 287-99.
- Busuttil, R. A., D. P. Munoz, et al. (2008). "Effect of Ku80 deficiency on mutation frequencies and spectra at a LacZ reporter locus in mouse tissues and cells." *PLoS One* **3**(10): e3458.
- Campisi, J. (2005). "Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors." *Cell* **120**(4): 513-22.
- Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(9): 729-40.
- Campisi, J., S. H. Kim, et al. (2001). "Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection." *Exp Gerontol* **36**(10): 1619-37.
- Casellas, R., A. Nussenzweig, et al. (1998). "Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching." *Embo J* **17**(8): 2404-11.
- Celeste, A., S. Petersen, et al. (2002). "Genomic instability in mice lacking histone H2AX." *Science* **296**(5569): 922-7.
- Celton-Morizur, S. and C. Desdouets (2010). "Polyploidization of liver cells." *Adv Exp Med Biol* **676**: 123-35.
- Colman, R. J., R. M. Anderson, et al. (2009). "Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys." *Science* **325**(5937): 201-4.
- Collado, M., M. A. Blasco, et al. (2007). "Cellular senescence in cancer and aging." *Cell* **130**(2): 223-33.
- Collins, K. (2000). "Mammalian telomeres and telomerase." *Curr Opin Cell Biol* **12**(3): 378-83.
- Connelly, J. C. and D. R. Leach (2002). "Tethering on the brink: the evolutionarily conserved Mre11-Rad50 complex." *Trends Biochem Sci* **27**(8): 410-8.
- Copp, A. J., N. D. Greene, et al. (2003). "The genetic basis of mammalian neurulation." *Nat Rev Genet* **4**(10): 784-93.
- Cromie, G. A. and D. R. Leach (2000). "Control of crossing over." *Mol Cell* **6**(4): 815-26.

- Chapman, T. and L. Partridge (1996). "Female fitness in *Drosophila melanogaster*: an interaction between the effect of nutrition and of encounter rate with males." Proc Biol Sci **263**(1371): 755-9.
- Chaudhuri, J. and F. W. Alt (2004). "Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair." Nat Rev Immunol **4**(7): 541-52.
- Chayot, R., A. Danckaert, et al. "Lack of DNA polymerase mu affects the kinetics of DNA double-strand break repair and impacts on cellular senescence." DNA Repair (Amst) **9**(11): 1187-99.
- Chen, J. J., D. Silver, et al. (1999). "BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway." Cancer Res **59**(7 Suppl): 1752s-1756s.
- Chen, X., L. J. Ko, et al. (1996). "p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells." Genes Dev **10**(19): 2438-51.
- Cheo, D. L., L. B. Meira, et al. (1996). "Synergistic interactions between XPC and p53 mutations in double-mutant mice: neural tube abnormalities and accelerated UV radiation-induced skin cancer." Curr Biol **6**(12): 1691-4.
- Chipchase, M. D., M. O'Neill, et al. (2003). "Characterization of premature liver polyploidy in DNA repair (Ercc1)-deficient mice." Hepatology **38**(4): 958-66.
- Chipuk, J. E. and D. R. Green (2004). "Cytoplasmic p53: bax and forward." Cell Cycle **3**(4): 429-31.
- Chipuk, J. E., T. Kuwana, et al. (2004). "Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis." Science **303**(5660): 1010-4.
- Chiu, A., L. Pan, et al. (2002). "DNA polymerase mu gene expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: an analysis utilizing in situ hybridization." Am J Pathol **161**(4): 1349-55.
- Chong, M. J., M. R. Murray, et al. (2000). "Atm and Bax cooperate in ionizing radiation-induced apoptosis in the central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 889-94.
- Dahm, K. (2007). "Functions and regulation of human artemis in double strand break repair." J Cell Biochem **100**(6): 1346-51.
- Dang, C. V., K. A. O'Donnell, et al. (2006). "The c-Myc target gene network." Semin Cancer Biol **16**(4): 253-64.
- Daniel, D. C. (2002). "Highlight: BRCA1 and BRCA2 proteins in breast cancer." Microsc Res Tech **59**(1): 68-83.
- de Boer, J., J. O. Andressoo, et al. (2002). "Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription." Science **296**(5571): 1276-9.
- de Boer, J. and J. H. Hoeijmakers (2000). "Nucleotide excision repair and human syndromes." Carcinogenesis **21**(3): 453-60.
- de Cavanagh, E. M., I. Flores, et al. (2008). "Renin-angiotensin system inhibitors protect against age-related changes in rat liver mitochondrial DNA content and gene expression." Exp Gerontol **43**(10): 919-28.
- De la Fuente, M. and J. Miquel (2009). "An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging." Curr Pharm Des **15**(26): 3003-26.
- Delarue, M., J. B. Boule, et al. (2002). "Crystal structures of a template-independent DNA polymerase: murine terminal deoxynucleotidyltransferase." EMBO J **21**(3): 427-39.

- Dempsey, J. L., Y. Odagiri, et al. (1993). "In vivo mutations at the H-2 locus in mouse lymphocytes." *Mutat Res* **285**(1): 45-51.
- Deng, C. X. and S. G. Brodie (2001). "Knockout mouse models and mammary tumorigenesis." *Semin Cancer Biol* **11**(5): 387-94.
- Deng, Y., X. Ren, et al. (2003). "A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis." *Cell* **115**(1): 61-70.
- DeRose, E. F., M. W. Clarkson, et al. (2007). "Solution structure of polymerase μ 's BRCT Domain reveals an element essential for its role in nonhomologous end joining." *Biochemistry* **46**(43): 12100-10.
- Desagher, S., A. Osen-Sand, et al. (1999). "Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis." *J Cell Biol* **144**(5): 891-901.
- Dias, S. S., D. M. Milne, et al. (2006). "c-Abl phosphorylates Hdm2 at tyrosine 276 in response to DNA damage and regulates interaction with ARF." *Oncogene* **25**(50): 6666-71.
- DiBiase, S. J., Z. C. Zeng, et al. (2000). "DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus." *Cancer Res* **60**(5): 1245-53.
- Dickey, J. S., B. J. Baird, et al. (2009). "Intercellular communication of cellular stress monitored by gamma-H2AX induction." *Carcinogenesis* **30**(10): 1686-95.
- Difilippantonio, M. J., S. Petersen, et al. (2002). "Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification." *J Exp Med* **196**(4): 469-80.
- Difilippantonio, M. J., J. Zhu, et al. (2000). "DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation." *Nature* **404**(6777): 510-4.
- Dominguez, O., J. F. Ruiz, et al. (2000). "DNA polymerase μ (Pol μ), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells." *Embo J* **19**(7): 1731-42.
- Donehower, L. A., L. A. Godley, et al. (1995). "Deficiency of p53 accelerates mammary tumorigenesis in Wnt-1 transgenic mice and promotes chromosomal instability." *Genes Dev* **9**(7): 882-95.
- Donehower, L. A., M. Harvey, et al. (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours." *Nature* **356**(6366): 215-21.
- Doria, G., P. Barattini, et al. (2004). "Role of immune responsiveness and DNA repair capacity genes in ageing." *Ageing Res Rev* **3**(2): 143-51.
- Dudley, D. D., J. Chaudhuri, et al. (2005). "Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences." *Adv Immunol* **86**: 43-112.
- Ellisen, L. W., K. D. Ramsayer, et al. (2002). "REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species." *Mol Cell* **10**(5): 995-1005.
- Epstein, A. C., J. M. Gleadle, et al. (2001). "C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation." *Cell* **107**(1): 43-54.
- Espejel, S. and M. A. Blasco (2002). "Identification of telomere-dependent "senescence-like" arrest in mouse embryonic fibroblasts." *Exp Cell Res* **276**(2): 242-8.

- Espejel, S., P. Klatt, et al. (2004). "Impact of telomerase ablation on organismal viability, aging, and tumorigenesis in mice lacking the DNA repair proteins PARP-1, Ku86, or DNA-PKcs." *J Cell Biol* **167**(4): 627-38.
- Espejel, S., M. Martin, et al. (2004). "Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs-deficient mice." *EMBO Rep* **5**(5): 503-9.
- Fabrizio, P., L. Battistella, et al. (2004). "Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* **166**(7): 1055-67.
- Falck, J., J. H. Petrini, et al. (2002). "The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways." *Nat Genet* **30**(3): 290-4.
- Fan, W. and X. Wu (2004). "DNA polymerase lambda can elongate on DNA substrates mimicking non-homologous end joining and interact with XRCC4-ligase IV complex." *Biochem Biophys Res Commun* **323**(4): 1328-33.
- Ferguson, D. O., J. M. Sekiguchi, et al. (2000). "The interplay between nonhomologous end-joining and cell cycle checkpoint factors in development, genomic stability, and tumorigenesis." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**: 395-403.
- Finkel, T., M. Serrano, et al. (2007). "The common biology of cancer and ageing." *Nature* **448**(7155): 767-74.
- Fontana, L. (2008). "Calorie restriction and cardiometabolic health." *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **15**(1): 3-9.
- Fortini, P., B. Pascucci, et al. (2003). "The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility." *Biochimie* **85**(11): 1053-71.
- Franco, S., M. Gostissa, et al. (2006). "H2AX prevents DNA breaks from progressing to chromosome breaks and translocations." *Mol Cell* **21**(2): 201-14.
- Frank, K. M., J. M. Sekiguchi, et al. (1998). "Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV." *Nature* **396**(6707): 173-7.
- Frank, K. M., N. E. Sharpless, et al. (2000). "DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway." *Mol Cell* **5**(6): 993-1002.
- Funk-Keenan, J., F. Haire, et al. (2008). "Hepatic endopolyploidy as a cellular consequence of age-specific selection for rate of development in mice." *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **310**(5): 385-97.
- Gao, Y., J. Chaudhuri, et al. (1998). "A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination." *Immunity* **9**(3): 367-76.
- Gao, Y., D. O. Ferguson, et al. (2000). "Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development." *Nature* **404**(6780): 897-900.
- Gao, Y., Y. Sun, et al. (1998). "A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis." *Cell* **95**(7): 891-902.
- Garcia-Diaz, M., K. Bebenek, et al. (2004). "A structural solution for the DNA polymerase lambda-dependent repair of DNA gaps with minimal homology." *Mol Cell* **13**(4): 561-72.
- Garcia-Diaz, M., K. Bebenek, et al. (2001). "Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase lambda: a possible role in base excision repair." *J Biol Chem* **276**(37): 34659-63.
- Garinis, G. A. (2008). "Nucleotide excision repair deficiencies and the somatotropic axis in aging." *Hormones (Athens)* **7**(1): 9-16.
- Gellert, M. (2002). "V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation." *Annu Rev Biochem* **71**: 101-32.

- Gerstbrein, B., G. Stamatas, et al. (2005). "In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*." *Aging Cell* **4**(3): 127-37.
- Gilfillan, S., C. Benoist, et al. (1995). "Mice lacking terminal deoxynucleotidyl transferase: adult mice with a fetal antigen receptor repertoire." *Immunol Rev* **148**: 201-19.
- Gladdy, R. A., M. D. Taylor, et al. (2003). "The RAG-1/2 endonuclease causes genomic instability and controls CNS complications of lymphoblastic leukemia in p53/Prkdc-deficient mice." *Cancer Cell* **3**(1): 37-50.
- Good, T. P. and M. Tatar (2001). "Age-specific mortality and reproduction respond to adult dietary restriction in *Drosophila melanogaster*." *J Insect Physiol* **47**(12): 1467-1473.
- Gozalbo-Lopez, B., P. Andrade, et al. (2009). "A role for DNA polymerase mu in the emerging DJH rearrangements of the postgastrulation mouse embryo." *Mol Cell Biol* **29**(5): 1266-75.
- Gradl, G., D. Faust, et al. (1995). "Density-dependent regulation of cell growth by contactinhibin and the contactinhibin receptor." *Curr Biol* **5**(5): 526-35.
- Grawunder, U., M. Wilm, et al. (1997). "Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells." *Nature* **388**(6641): 492-5.
- Grawunder, U., D. Zimmer, et al. (1998). "DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes." *Mol Cell* **2**(4): 477-84.
- Grawunder, U., D. Zimmer, et al. (1998). "Requirement for an interaction of XRCC4 with DNA ligase IV for wild-type V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in vivo." *J Biol Chem* **273**(38): 24708-14.
- Greenberg, R. A., R. C. Allsopp, et al. (1998). "Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation." *Oncogene* **16**(13): 1723-30.
- Grinberg, S., G. Teiblum, et al. (2010). "p53 in cytoplasm exerts 3'-->5' exonuclease activity with dsRNA." *Cell Cycle* **9**(12).
- Gu, J., H. Lu, et al. (2007). "XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps." *Embo J* **26**(4): 1010-23.
- Gu, Y., K. J. Seidl, et al. (1997). "Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice." *Immunity* **7**(5): 653-65.
- Guidos, C. J., C. J. Williams, et al. (1996). "V(D)J recombination activates a p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors." *Genes Dev* **10**(16): 2038-54.
- Guirouilh-Barbat, J., S. Huck, et al. (2004). "Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells." *Mol Cell* **14**(5): 611-23.
- Guirouilh-Barbat, J., S. Huck, et al. (2008). "S-phase progression stimulates both the mutagenic KU-independent pathway and mutagenic processing of KU-dependent intermediates, for nonhomologous end joining." *Oncogene* **27**(12): 1726-36.
- Guirouilh-Barbat, J., E. Rass, et al. (2007). "Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(52): 20902-7.
- Gupta, S. (2000). "Hepatic polyploidy and liver growth control." *Semin Cancer Biol* **10**(3): 161-71.
- Haber, J. E. (1998). "The many interfaces of Mre11." *Cell* **95**(5): 583-6.

- Hainaut, P. and M. Hollstein (2000). "p53 and human cancer: the first ten thousand mutations." *Adv Cancer Res* **77**: 81-137.
- Harley, C. B., A. B. Futcher, et al. (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." *Nature* **345**(6274): 458-60.
- Harrigan, J. A., J. Fan, et al. (2007). "WRN exonuclease activity is blocked by DNA termini harboring 3' obstructive groups." *Mech Ageing Dev* **128**(3): 259-66.
- Harris, M. J. and D. M. Juriloff (2007). "Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **79**(3): 187-210.
- Harvey, M., A. T. Sands, et al. (1993). "In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice." *Oncogene* **8**(9): 2457-67.
- Hasty, P., J. Campisi, et al. (2003). "Aging and genome maintenance: lessons from the mouse?" *Science* **299**(5611): 1355-9.
- Hasty, P. and J. Vijg (2002). "Aging. Genomic priorities in aging." *Science* **296**(5571): 1250-1.
- Hayflick, L. (1965). "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." *Exp Cell Res* **37**: 614-36.
- Helleday, T. (2003). "Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells." *Mutat Res* **532**(1-2): 103-15.
- Herrero, C., L. Marques, et al. (2001). "IFN-gamma-dependent transcription of MHC class II IA is impaired in macrophages from aged mice." *J Clin Invest* **107**(4): 485-93.
- Herrero, C., C. Sebastian, et al. (2002). "Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression." *Exp Gerontol* **37**(2-3): 389-94.
- Hindle, J. V. "Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease." *Age Ageing* **39**(2): 156-61.
- Hirao, A., A. Cheung, et al. (2002). "Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner." *Mol Cell Biol* **22**(18): 6521-32.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature* **411**(6835): 366-74.
- Hollstein, M., D. Sidransky, et al. (1991). "p53 mutations in human cancers." *Science* **253**(5015): 49-53.
- Honda, R., H. Tanaka, et al. (1997). "Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53." *FEBS Lett* **420**(1): 25-7.
- Houtsmuller, A. B., S. Rademakers, et al. (1999). "Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells." *Science* **284**(5416): 958-61.
- Hursting, S. D., S. M. Smith, et al. "Calories and carcinogenesis: lessons learned from 30 years of calorie restriction research." *Carcinogenesis* **31**(1): 83-9.
- Ihrie, R. A. and L. D. Attardi (2004). "Perp-etrating p53-dependent apoptosis." *Cell Cycle* **3**(3): 267-9.
- Ihrie, R. A., E. Reczek, et al. (2003). "Perp is a mediator of p53-dependent apoptosis in diverse cell types." *Curr Biol* **13**(22): 1985-90.
- Imen, J. S., L. Billiet, et al. (2009). "The regulated in development and DNA damage response 2 (REDD2) gene mediates human monocyte cell death through a reduction in thioredoxin-1 expression." *Free Radic Biol Med* **46**(10): 1404-10.
- Irani, K., Y. Xia, et al. (1997). "Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts." *Science* **275**(5306): 1649-52.
- Itahana, K., J. Campisi, et al. (2004). "Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells." *Biogerontology* **5**(1): 1-10.

- Ivan, M., T. Haberberger, et al. (2002). "Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13459-64.
- Jacks, T., L. Remington, et al. (1994). "Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice." *Curr Biol* **4**(1): 1-7.
- Jacobs, P. A., M. Brunton, et al. (1963). "Change of human chromosome count distribution with age: evidence for a sex differences." *Nature* **197**: 1080-1.
- Jacobs, P. A., W. M. Court Brown, et al. (1961). "Distribution of human chromosome counts in relation to age." *Nature* **191**: 1178-80.
- Janus, F., N. Albrechtsen, et al. (1999). "Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding." *Mol Cell Biol* **19**(3): 2155-68.
- Jeffers, J. R., E. Parganas, et al. (2003). "Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways." *Cancer Cell* **4**(4): 321-8.
- Jhanwar-Uniyal, M. (2003). "BRCA1 in cancer, cell cycle and genomic stability." *Front Biosci* **8**: s1107-17.
- Jiang, J. C., E. Jaruga, et al. (2000). "An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast." *Faseb J* **14**(14): 2135-7.
- Jones, I. M., C. B. Thomas, et al. (1995). "Impact of age and environment on somatic mutation at the hprt gene of T lymphocytes in humans." *Mutat Res* **338**(1-6): 129-39.
- Joseph, J., G. Cole, et al. (2009). "Nutrition, brain aging, and neurodegeneration." *J Neurosci* **29**(41): 12795-801.
- Juarez, R., J. F. Ruiz, et al. (2006). "A specific loop in human DNA polymerase mu allows switching between creative and DNA-instructed synthesis." *Nucleic Acids Res* **34**(16): 4572-82.
- Jung, D. and F. W. Alt (2004). "Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation." *Cell* **116**(2): 299-311.
- Kallioniemi, A., O. P. Kallioniemi, et al. (1992). "Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors." *Science* **258**(5083): 818-21.
- Karanjawala, Z. E., U. Grawunder, et al. (1999). "The nonhomologous DNA end joining pathway is important for chromosome stability in primary fibroblasts." *Curr Biol* **9**(24): 1501-4.
- Karanjawala, Z. E. and M. R. Lieber (2004). "DNA damage and aging." *Mech Ageing Dev* **125**(6): 405-16.
- Kennedy, B. K., K. K. Steffen, et al. (2007). "Ruminations on dietary restriction and aging." *Cell Mol Life Sci* **64**(11): 1323-8.
- Kirschner, K., R. Singh, et al. (2007). "Characterisation of Ercc1 deficiency in the liver and in conditional Ercc1-deficient primary hepatocytes in vitro." *DNA Repair (Amst)* **6**(3): 304-16.
- Kivirikko, K. I. and J. Myllyharju (1998). "Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit." *Matrix Biol* **16**(7): 357-68.
- Ko, L. J. and C. Prives (1996). "p53: puzzle and paradigm." *Genes Dev* **10**(9): 1054-72.
- Komori, T., L. Pricop, et al. (1996). "Repertoires of antigen receptors in Tdt congenitally deficient mice." *Int Rev Immunol* **13**(4): 317-25.
- Kotnis, A., L. Du, et al. (2009). "Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**(1517): 653-65.
- Krabbe, K. S., M. Pedersen, et al. (2004). "Inflammatory mediators in the elderly." *Exp Gerontol* **39**(5): 687-99.

- Kujoth, G. C., A. Hiona, et al. (2005). "Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging." *Science* **309**(5733): 481-4.
- Lahav, G., N. Rosenfeld, et al. (2004). "Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells." *Nat Genet* **36**(2): 147-50.
- Lakowski, B. and S. Hekimi (1998). "The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 13091-6.
- Landis, G. N. and J. Tower (2005). "Superoxide dismutase evolution and life span regulation." *Mech Ageing Dev* **126**(3): 365-79.
- Lapointe, J. and S. Hekimi "When a theory of aging ages badly." *Cell Mol Life Sci* **67**(1): 1-8.
- Lee, J. and S. Desiderio (1999). "Cyclin A/CDK2 regulates V(D)J recombination by coordinating RAG-2 accumulation and DNA repair." *Immunity* **11**(6): 771-81.
- Lee, J. W., L. Blanco, et al. (2004). "Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts." *J Biol Chem* **279**(1): 805-11.
- Lee, S., E. Nakamura, et al. (2005). "Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer." *Cancer Cell* **8**(2): 155-67.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1997). "Genetic instability in colorectal cancers." *Nature* **386**(6625): 623-7.
- Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." *Cell* **88**(3): 323-31.
- Li, A. G., L. G. Piluso, et al. (2006). "Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN." *Mol Cell* **23**(4): 575-87.
- Li, G., F. W. Alt, et al. (2008). "Lymphocyte-specific compensation for XLF/cernunnos end-joining functions in V(D)J recombination." *Mol Cell* **31**(5): 631-40.
- Li, H., H. Vogel, et al. (2007). "Deletion of Ku70, Ku80, or both causes early aging without substantially increased cancer." *Mol Cell Biol* **27**(23): 8205-14.
- Li, Z., C. J. Woo, et al. (2004). "The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination." *Genes Dev* **18**(1): 1-11.
- Lieber, M. R., Y. Ma, et al. (2004). "The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination." *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 817-26.
- Lilling, G., N. Elena, et al. (2003). "p53-associated 3'-->5' exonuclease activity in nuclear and cytoplasmic compartments of cells." *Oncogene* **22**(2): 233-45.
- Lim, D. S. and P. Hasty (1996). "A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53." *Mol Cell Biol* **16**(12): 7133-43.
- Lim, D. S., H. Vogel, et al. (2000). "Analysis of ku80-mutant mice and cells with deficient levels of p53." *Mol Cell Biol* **20**(11): 3772-80.
- Lin, F., Y. Chen, et al. (2000). "[P53 delta 37 protein exhibits 3'-5' exonuclease activity]." *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* **31**(1): 21-3.
- Lin, S. J., P. A. Defossez, et al. (2000). "Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*." *Science* **289**(5487): 2126-8.
- Lindahl, T. and R. D. Wood (1999). "Quality control by DNA repair." *Science* **286**(5446): 1897-905.
- Lipscomb, E. A., P. D. Sarmiere, et al. (1999). "Expression of the SM-20 gene promotes death in nerve growth factor-dependent sympathetic neurons." *J Neurochem* **73**(1): 429-32.

- Lipscomb, E. A., P. D. Sarmiere, et al. (2001). "SM-20 is a novel mitochondrial protein that causes caspase-dependent cell death in nerve growth factor-dependent neurons." *J Biol Chem* **276**(7): 5085-92.
- Liu, X., J. L. Karnell, et al. "Distinct roles for PTEN in prevention of T cell lymphoma and autoimmunity in mice." *J Clin Invest* **120**(7): 2497-507.
- Livingstone, L. R., A. White, et al. (1992). "Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53." *Cell* **70**(6): 923-35.
- Lombard, D. B., K. F. Chua, et al. (2005). "DNA repair, genome stability, and aging." *Cell* **120**(4): 497-512.
- Lowe, S. W. and C. J. Sherr (2003). "Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles." *Curr Opin Genet Dev* **13**(1): 77-83.
- Lucas, D., B. Escudero, et al. (2009). "Altered hematopoiesis in mice lacking DNA polymerase mu is due to inefficient double-strand break repair." *PLoS Genet* **5**(2): e1000389.
- Lucas, D., T. Lain de Lera, et al. (2005). "Polymerase mu is up-regulated during the T cell-dependent immune response and its deficiency alters developmental dynamics of spleen centroblasts." *Eur J Immunol* **35**(5): 1601-11.
- Ludwig, T., P. Fisher, et al. (2001). "Tumorigenesis in mice carrying a truncating Brcal mutation." *Genes Dev* **15**(10): 1188-93.
- Lumsden, J. M., T. McCarty, et al. (2004). "Immunoglobulin class switch recombination is impaired in Atm-deficient mice." *J Exp Med* **200**(9): 1111-21.
- Luo, G., M. S. Yao, et al. (1999). "Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7376-81.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**(4): 481-90.
- Ma, Y., H. Lu, et al. (2004). "A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining." *Mol Cell* **16**(5): 701-13.
- Ma, Y., U. Pannicke, et al. (2002). "Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination." *Cell* **108**(6): 781-94.
- Mahajan, K. N., S. A. Nick McElhinny, et al. (2002). "Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair." *Mol Cell Biol* **22**(14): 5194-202.
- Mahaney, B. L., K. Meek, et al. (2009). "Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining." *Biochem J* **417**(3): 639-50.
- Manis, J. P., Y. Gu, et al. (1998). "Ku70 is required for late B cell development and immunoglobulin heavy chain class switching." *J Exp Med* **187**(12): 2081-9.
- Manis, J. P., J. C. Morales, et al. (2004). "53BP1 links DNA damage-response pathways to immunoglobulin heavy chain class-switch recombination." *Nat Immunol* **5**(5): 481-7.
- Manis, J. P., M. Tian, et al. (2002). "Mechanism and control of class-switch recombination." *Trends Immunol* **23**(1): 31-9.
- Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." *Cell* **129**(7): 1261-74.
- Mardon, G. and D. C. Page (1989). "The sex-determining region of the mouse Y chromosome encodes a protein with a highly acidic domain and 13 zinc fingers." *Cell* **56**(5): 765-70.

- Martin, G. M. (2005). "Genetic modulation of senescent phenotypes in Homo sapiens." *Cell* **120**(4): 523-32.
- Martin, G. M. and J. Oshima (2000). "Lessons from human progeroid syndromes." *Nature* **408**(6809): 263-6.
- Matsumoto, Y. and K. Kim (1995). "Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair." *Science* **269**(5224): 699-702.
- Matsumoto, Y., N. Suzuki, et al. (2000). "Cleavage and phosphorylation of XRCC4 protein induced by X-irradiation." *FEBS Lett* **478**(1-2): 67-71.
- McElhaney, J. E. and R. B. Effros (2009). "Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults?" *Curr Opin Immunol* **21**(4): 418-24.
- Meek, K., V. Dang, et al. (2008). "DNA-PK: the means to justify the ends?" *Adv Immunol* **99**: 33-58.
- Meek, K., S. Gupta, et al. (2004). "The DNA-dependent protein kinase: the director at the end." *Immunol Rev* **200**: 132-41.
- Mimori, T. and J. A. Hardin (1986). "Mechanism of interaction between Ku protein and DNA." *J Biol Chem* **261**(22): 10375-9.
- Miyashita, T., S. Krajewski, et al. (1994). "Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo." *Oncogene* **9**(6): 1799-805.
- Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." *Cell* **80**(2): 293-9.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, et al. (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." *Cell* **68**(5): 869-77.
- Moon, A. F., M. Garcia-Diaz, et al. (2007). "The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases." *DNA Repair (Amst)* **6**(12): 1709-25.
- Moon, A. F., M. Garcia-Diaz, et al. (2007). "Structural insight into the substrate specificity of DNA Polymerase mu." *Nat Struct Mol Biol* **14**(1): 45-53.
- Moore, A., C. J. Donahue, et al. (1998). "Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death." *Methods Cell Biol* **57**: 265-78.
- Morimoto, R. I. and A. M. Cuervo (2009). "Protein homeostasis and aging: taking care of proteins from the cradle to the grave." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **64**(2): 167-70.
- Morley, A. A. (1995). "The somatic mutation theory of ageing." *Mutat Res* **338**(1-6): 19-23.
- Moshous, D., I. Callebaut, et al. (2001). "Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency." *Cell* **105**(2): 177-86.
- Moynahan, M. E. (2002). "The cancer connection: BRCA1 and BRCA2 tumor suppression in mice and humans." *Oncogene* **21**(58): 8994-9007.
- Mueller, G. A., A. F. Moon, et al. (2008). "A comparison of BRCT domains involved in nonhomologous end-joining: introducing the solution structure of the BRCT domain of polymerase lambda." *DNA Repair (Amst)* **7**(8): 1340-51.
- Mukherjee, A. B. and C. Costello (1998). "Aneuploidy analysis in fibroblasts of human premature aging syndromes by FISH during in vitro cellular aging." *Mech Ageing Dev* **103**(2): 209-22.
- Mullan, P. B., J. E. Quinn, et al. (2006). "The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control." *Oncogene* **25**(43): 5854-63.
- Nacht, M., A. Strasser, et al. (1996). "Mutations in the p53 and SCID genes cooperate in tumorigenesis." *Genes Dev* **10**(16): 2055-66.

- Nakatsuji, Y. and R. H. Miller (1998). "Homotypic cell contact-dependent inhibition of astrocyte proliferation." *Glia* **22**(4): 379-89.
- Narita, M., S. Nunez, et al. (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." *Cell* **113**(6): 703-16.
- Natarajan, A. T. (1993). "Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations." *Environ Health Perspect* **101 Suppl 3**: 225-9.
- Nelson, W. G. and M. B. Kastan (1994). "DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways." *Mol Cell Biol* **14**(3): 1815-23.
- Neuberger, M. S. (2008). "Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards." *Immunol Cell Biol* **86**(2): 124-32.
- Nevaldine, B., J. A. Longo, et al. (1997). "The scid defect results in much slower repair of DNA double-strand breaks but not high levels of residual breaks." *Radiat Res* **147**(5): 535-40.
- Nick McElhinny, S. A., J. M. Havener, et al. (2005). "A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining." *Mol Cell* **19**(3): 357-66.
- Niedernhofer, L. J., G. A. Garinis, et al. (2006). "A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis." *Nature* **444**(7122): 1038-43.
- Nussenzweig, A., C. Chen, et al. (1996). "Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination." *Nature* **382**(6591): 551-5.
- O'Driscoll, M. and P. A. Jeggo (2006). "The role of double-strand break repair - insights from human genetics." *Nat Rev Genet* **7**(1): 45-54.
- Ohki, R., T. Tsurimoto, et al. (2001). "In vitro reconstitution of the end replication problem." *Mol Cell Biol* **21**(17): 5753-66.
- Ohtani, N., D. J. Mann, et al. (2009). "Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging." *Cancer Sci* **100**(5): 792-7.
- Olovnikov, A. M. (1973). "A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon." *J Theor Biol* **41**(1): 181-90.
- Oren, M. and V. Rotter (1999). "Introduction: p53--the first twenty years." *Cell Mol Life Sci* **55**(1): 9-11.
- Orsburn, B., B. Escudero, et al. "Differential requirement for H2AX and 53BP1 in organismal development and genome maintenance in the absence of poly(ADP)ribosyl polymerase 1." *Mol Cell Biol* **30**(10): 2341-52.
- Ouchi, T., A. N. Monteiro, et al. (1998). "BRCA1 regulates p53-dependent gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2302-6.
- Oyama, G., K. Yoshimi, et al. "Impaired in vivo dopamine release in parkin knockout mice." *Brain Res* **1352**: 214-22.
- Padmanabhan, R. (2006). "Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects." *Congenit Anom (Kyoto)* **46**(2): 55-67.
- Parrinello, S., E. Samper, et al. (2003). "Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts." *Nat Cell Biol* **5**(8): 741-7.
- Paull, T. T. (2005). "Saving the ends for last: the role of pol mu in DNA end joining." *Mol Cell* **19**(3): 294-6.
- Pendergrass, W., N. Wolf, et al. (2004). "Efficacy of MitoTracker Green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues." *Cytometry A* **61**(2): 162-9.

- Petrie, H. T. and J. C. Zuniga-Pflucker (2007). "Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus." *Annu Rev Immunol* **25**: 649-79.
- Pfeiffer, P., W. Goedecke, et al. (2000). "Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations." *Mutagenesis* **15**(4): 289-302.
- Pilch, D. R., O. A. Sedelnikova, et al. (2003). "Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites." *Biochem Cell Biol* **81**(3): 123-9.
- Prolla, T. A. (2002). "DNA microarray analysis of the aging brain." *Chem Senses* **27**(3): 299-306.
- Ramadan, K., I. Shevelev, et al. (2004). "The DNA-polymerase-X family: controllers of DNA quality?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(12): 1038-43.
- Reina-San-Martin, B., H. T. Chen, et al. (2004). "ATM is required for efficient recombination between immunoglobulin switch regions." *J Exp Med* **200**(9): 1103-10.
- Reina-San-Martin, B., J. Chen, et al. (2007). "Enhanced intra-switch region recombination during immunoglobulin class switch recombination in 53BP1-/- B cells." *Eur J Immunol* **37**(1): 235-9.
- Reina-San-Martin, B., S. Difilippantonio, et al. (2003). "H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation." *J Exp Med* **197**(12): 1767-78.
- Reynaud, C. A., S. Frey, et al. (2001). "Transcription, beta-like DNA polymerases and hypermutation." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1405): 91-7.
- Richardson, C. and M. Jasin (2000). "Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks." *Nature* **405**(6787): 697-700.
- Rockwood, L. D., A. Nussenzweig, et al. (2003). "Paradoxical decrease in mutant frequencies and chromosomal rearrangements in a transgenic lacZ reporter gene in Ku80 null mice deficient in DNA double strand break repair." *Mutat Res* **529**(1-2): 51-8.
- Rogakou, E. P., C. Boon, et al. (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." *J Cell Biol* **146**(5): 905-16.
- Roth, D. B. and J. H. Wilson (1986). "Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction." *Mol Cell Biol* **6**(12): 4295-304.
- Ruiz, J. F., O. Dominguez, et al. (2001). "DNA polymerase mu, a candidate hypermutase?" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1405): 99-109.
- Ruiz, J. F., R. Juarez, et al. (2003). "Lack of sugar discrimination by human Pol mu requires a single glycine residue." *Nucleic Acids Res* **31**(15): 4441-9.
- Ruiz, J. F., D. Lucas, et al. (2004). "Overexpression of human DNA polymerase mu (Pol mu) in a Burkitt's lymphoma cell line affects the somatic hypermutation rate." *Nucleic Acids Res* **32**(19): 5861-73.
- Sagara, S., K. Sugaya, et al. (1997). "B220 expression by T lymphoid progenitor cells in mouse fetal liver." *J Immunol* **158**(2): 666-76.
- Sah, V. P., L. D. Attardi, et al. (1995). "A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly." *Nat Genet* **10**(2): 175-80.
- Sahara, S., M. Aoto, et al. (1999). "Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation." *Nature* **401**(6749): 168-73.
- Samper, E., L. Morgado, et al. (2009). "Increase in mitochondrial biogenesis, oxidative stress, and glycolysis in murine lymphomas." *Free Radic Biol Med* **46**(3): 387-96.

- Scully, R. and D. M. Livingston (2000). "In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2." *Nature* **408**(6811): 429-32.
- Schlisio, S. (2009). "Neuronal apoptosis by prolyl hydroxylation: implication in nervous system tumours and the Warburg conundrum." *J Cell Mol Med* **13**(10): 4104-12.
- Schofield, C. J. and Z. Zhang (1999). "Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes." *Curr Opin Struct Biol* **9**(6): 722-31.
- Schriner, S. E., N. J. Linford, et al. (2005). "Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria." *Science* **308**(5730): 1909-11.
- Schuler, M., E. Bossy-Wetzel, et al. (2000). "p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release." *J Biol Chem* **275**(10): 7337-42.
- Selfridge, J., K. T. Hsia, et al. (2001). "Correction of liver dysfunction in DNA repair-deficient mice with an ERCC1 transgene." *Nucleic Acids Res* **29**(22): 4541-50.
- Selivanova, G. and K. G. Wiman (1995). "p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage." *Adv Cancer Res* **66**: 143-80.
- Seller, M. J. (1987). "Neural tube defects and sex ratios." *Am J Med Genet* **26**(3): 699-707.
- Seller, M. J. (1995). "Sex, neural tube defects, and multisite closure of the human neural tube." *Am J Med Genet* **58**(4): 332-6.
- Serrano, M. and M. A. Blasco (2001). "Putting the stress on senescence." *Curr Opin Cell Biol* **13**(6): 748-53.
- Serrano, M., E. Gomez-Lahoz, et al. (1995). "Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4." *Science* **267**(5195): 249-52.
- Serrano, M., H. Lee, et al. (1996). "Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality." *Cell* **85**(1): 27-37.
- Shakke, Z., M. Yavnilovitch, et al. (2002). "DNA binding and 3'-5' exonuclease activity in the murine alternatively-spliced p53 protein." *Oncogene* **21**(33): 5117-26.
- Sharan, S. K., M. Morimatsu, et al. (1997). "Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2." *Nature* **386**(6627): 804-10.
- Sharpless, N. E. and R. A. DePinho (2004). "Telomeres, stem cells, senescence, and cancer." *J Clin Invest* **113**(2): 160-8.
- Shen, W. H., A. S. Balajee, et al. (2007). "Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity." *Cell* **128**(1): 157-70.
- Sherr, C. J. and R. A. DePinho (2000). "Cellular senescence: mitotic clock or culture shock?" *Cell* **102**(4): 407-10.
- Shieh, S. Y., M. Ikeda, et al. (1997). "DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2." *Cell* **91**(3): 325-34.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." *Nat Rev Cancer* **3**(3): 155-68.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM: ready, set, go." *Cell Cycle* **2**(2): 116-7.
- Shiloh, Y. and M. B. Kastan (2001). "ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths." *Adv Cancer Res* **83**: 209-54.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, et al. (1992). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." *Cell* **68**(5): 855-67.
- Skalski, V., Z. Y. Lin, et al. (2000). "Substrate specificity of the p53-associated 3'-5' exonuclease." *Oncogene* **19**(29): 3321-9.

- Soengas, M. S., R. M. Alarcon, et al. (1999). "Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition." *Science* **284**(5411): 156-9.
- Sonoda, E., M. S. Sasaki, et al. (1999). "Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells." *Mol Cell Biol* **19**(7): 5166-9.
- Soulas-Sprauel, P., G. Le Guyader, et al. (2007). "Role for DNA repair factor XRCC4 in immunoglobulin class switch recombination." *J Exp Med* **204**(7): 1717-27.
- Spira, J., F. Wiener, et al. (1979). "Is trisomy cause or consequence of murine T cell leukemia development? Studies on Robertsonian translocation mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(12): 6619-21.
- Stavnezer, J. (1996). "Antibody class switching." *Adv Immunol* **61**: 79-146.
- Stavnezer, J., J. E. Guikema, et al. (2008). "Mechanism and regulation of class switch recombination." *Annu Rev Immunol* **26**: 261-92.
- Steinkraus, K. A., E. D. Smith, et al. (2008). "Dietary restriction suppresses proteotoxicity and enhances longevity by an hsf-1-dependent mechanism in *Caenorhabditis elegans*." *Aging Cell* **7**(3): 394-404.
- Storchova, Z. and D. Pellman (2004). "From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(1): 45-54.
- Strathern, J. N., B. K. Shafer, et al. (1995). "DNA synthesis errors associated with double-strand-break repair." *Genetics* **140**(3): 965-72.
- Straub, J. A., E. A. Lipscomb, et al. (2003). "Induction of SM-20 in PC12 cells leads to increased cytochrome c levels, accumulation of cytochrome c in the cytosol, and caspase-dependent cell death." *J Neurochem* **85**(2): 318-28.
- Suzuki, A., M. T. Yamaguchi, et al. (2001). "T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance." *Immunity* **14**(5): 523-34.
- Takai, H., K. Naka, et al. (2002). "Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription." *Embo J* **21**(19): 5195-205.
- Teng, D. H., R. Hu, et al. (1997). "MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines." *Cancer Res* **57**(23): 5221-5.
- Thompson, L. H., K. W. Brookman, et al. (1990). "Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange." *Mol Cell Biol* **10**(12): 6160-71.
- Thompson, L. H. and D. Schild (2001). "Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability." *Mutat Res* **477**(1-2): 131-53.
- Todaro, G. J. and H. Green (1963). "Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines." *J Cell Biol* **17**: 299-313.
- Tokoro, Y., T. Sugawara, et al. (1998). "A mouse carrying genetic defect in the choice between T and B lymphocytes." *J Immunol* **161**(9): 4591-8.
- Tolbert, D., X. Lu, et al. (2002). "p19(ARF) is dispensable for oncogenic stress-induced p53-mediated apoptosis and tumor suppression in vivo." *Mol Cell Biol* **22**(1): 370-7.
- Tong, W. M., U. Cortes, et al. (2002). "Synergistic role of Ku80 and poly(ADP-ribose) polymerase in suppressing chromosomal aberrations and liver cancer formation." *Cancer Res* **62**(23): 6990-6.
- Tornaletti, S. and P. C. Hanawalt (1999). "Effect of DNA lesions on transcription elongation." *Biochimie* **81**(1-2): 139-46.
- Trifunovic, A., A. Wredenberg, et al. (2004). "Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase." *Nature* **429**(6990): 417-23.

- Tsai, C. J., S. A. Kim, et al. (2007). "Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7851-6.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- van den Boom, V., N. G. Jaspers, et al. (2002). "When machines get stuck--obstructed RNA polymerase II: displacement, degradation or suicide." Bioessays **24**(9): 780-4.
- van Gent, D. C., J. H. Hoeijmakers, et al. (2001). "Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection." Nat Rev Genet **2**(3): 196-206.
- Van Raamsdonk, J. M. and S. Hekimi (2009). "Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." PLoS Genet **5**(2): e1000361.
- Vanasse, G. J., P. Concannon, et al. (1999). "Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage." Blood **94**(12): 3997-4010.
- Venkatachalam, S., Y. P. Shi, et al. (1998). "Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation." Embo J **17**(16): 4657-67.
- Villunger, A., E. M. Michalak, et al. (2003). "p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa." Science **302**(5647): 1036-8.
- Vogel, H., D. S. Lim, et al. (1999). "Deletion of Ku86 causes early onset of senescence in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10770-5.
- von Boehmer, H. (1988). "The developmental biology of T lymphocytes." Annu Rev Immunol **6**: 309-26.
- Vousden, K. H. and X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.
- Wagner, W., P. Horn, et al. (2008). "Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process." PLoS One **3**(5): e2213.
- Wang, H., B. Rosidi, et al. (2005). "DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining." Cancer Res **65**(10): 4020-30.
- Wei, M. C., T. Lindsten, et al. (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." Genes Dev **14**(16): 2060-71.
- Wilson, D. M., 3rd and L. H. Thompson (2007). "Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange." Mutat Res **616**(1-2): 11-23.
- Wilson, T. E. and M. R. Lieber (1999). "Efficient processing of DNA ends during yeast nonhomologous end joining. Evidence for a DNA polymerase beta (Pol4)-dependent pathway." J Biol Chem **274**(33): 23599-609.
- Willerford, D. M., W. Swat, et al. (1996). "Developmental regulation of V(D)J recombination and lymphocyte differentiation." Curr Opin Genet Dev **6**(5): 603-9.
- Woo, R. A. and R. Y. Poon (2004). "Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation." Genes Dev **18**(11): 1317-30.
- Wright, W. E. and J. W. Shay (2000). "Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology." Nat Med **6**(8): 849-51.

- Wu, P. Y., P. Frit, et al. (2007). "Interplay between Cernunnos-XLF and nonhomologous end-joining proteins at DNA ends in the cell." *J Biol Chem* **282**(44): 31937-43.
- Wu, X., J. Feng, et al. (2003). "Immunoglobulin somatic hypermutation: double-strand DNA breaks, AID and error-prone DNA repair." *J Clin Immunol* **23**(4): 235-46.
- Xie, X. W., M. H. Mei, et al. (2009). "Expression of CIITA-related MHCII molecules in tumors linked to prognosis in hepatocellular carcinoma." *Int J Oncol* **34**(3): 681-8.
- Xu, X., L. M. Tsvetkov, et al. (2002). "Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization." *Mol Cell Biol* **22**(12): 4419-32.
- Yamaguchi-Iwai, Y., E. Sonoda, et al. (1999). "Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells." *Embo J* **18**(23): 6619-29.
- Yamrich, J. and J. B. Sweasy "DNA polymerase family X: function, structure, and cellular roles." *Biochim Biophys Acta* **1804**(5): 1136-50.
- Yan, C. T., C. Boboila, et al. (2007). "IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway." *Nature* **449**(7161): 478-82.
- Yang, E. S. and F. Xia "BRCA1 16 years later: DNA damage-induced BRCA1 shuttling." *FEBS J* **277**(15): 3079-85.
- Yang, Y. G., U. Cortes, et al. (2004). "Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks." *Oncogene* **23**(21): 3872-82.
- Yin, X., J. Wright, et al. "Brain endothelial cells synthesize neurotoxic thrombin in Alzheimer's disease." *Am J Pathol* **176**(4): 1600-6.
- Zahn, J. M., R. Sonu, et al. (2006). "Transcriptional profiling of aging in human muscle reveals a common aging signature." *PLoS Genet* **2**(7): e115.
- Zhang, X., S. Morera, et al. (1998). "Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module." *Embo J* **17**(21): 6404-11.
- Zhang, Y., X. Wu, et al. (2001). "Highly frequent frameshift DNA synthesis by human DNA polymerase mu." *Mol Cell Biol* **21**(23): 7995-8006.
- Zheng, H., H. Ying, et al. (2008). "p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation." *Nature* **455**(7216): 1129-33.
- Zhu, C., K. D. Mills, et al. (2002). "Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations." *Cell* **109**(7): 811-21.
- Zhu, C. and D. B. Roth (1995). "Characterization of coding ends in thymocytes of scid mice: implications for the mechanism of V(D)J recombination." *Immunity* **2**(1): 101-12.
- Zhu, W., T. Abbas, et al. (2005). "DNA replication and genomic instability." *Adv Exp Med Biol* **570**: 249-79.
- Zhu, X. D., L. Niedernhofer, et al. (2003). "ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes." *Mol Cell* **12**(6): 1489-98.
- Zijlmans, J. M., U. M. Martens, et al. (1997). "Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7423-8.
- Zindy, F., C. M. Eischen, et al. (1998). "Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization." *Genes Dev* **12**(15): 2424-33.

Anexo

Genotipo	tumor	localización	Cromosoma	Citobanda	Inicio	Fin	Amplificación	Deleción
$\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$	1	BAZO	chr6	qB3	60634325	60968488	0	-0,910548
	2	GANGLIO	chr11	qD	100269226	100586134	0	-0,395128
			chr13	qA3.3 - qD2.3	38337770	120264684	0	-0,511249
			chr14	qC2	54156127	54810615	0	-1,483926
			chr17	qB1 - qE5	36115249	95235265	0,413306	0
			chr5	qG1.2 - qG1.3	127470755	129410634	0	-0,618106
			chr5	qG1.3	129439155	130864918	0,473761	0
			chr5	qG2	137958890	138649270	0,83445	0
			chr5	qG3	149561361	151342754	0,458842	0
			chr5	qG3	151362858	152489988	0	-0,629755
			chr6	qB1	41101304	41480845	0	-0,647123
			chr3	posible momosomía				
	3	TIMO	chr19	qA - qD3	3159609	61310293	0	-0,732115
			chr12	posible momosomía				
	4	TIMO	chr11	trisomía				
			chr17	qD - qE1.1	57642598	94961561	0	-1,025389
			chr19	qC1 - qD3	32573989	61310293	0	-0,69645
			chr5	qA3 - qG3	19422781	152489988	0,324196	0
			chrX	qA1.1 - qF5	4989984	166316423	0	-0,348007
	5	TIMO	chr1	qE3	127643742	127687884	0	-0,686763
			chr1	qE4	133162743	133206810	0	-0,706442
			chr11	qA4 - qE2	33595717	121710057	0,330363	0
			chr14	qC2	54390811	54574177	0	-0,856662
			chr15	qA1 - qF3	3197700	103432967	0,338664	0
			chr19	qC1	32845066	33113561	0	-2,528168
			chr3	qG3	130904009	131043407	0,613065	0
			chr5	qA1 - qG3	3324972	152489988	0,485799	0
			chr6	qB1	41018189	41480845	0	-0,781543
			chr7	qF3	133880330	135007688	0	-0,665314
			chr9	qC	66638734	67178016	0,588604	0
			chr19	deleción terminal visual				
	6	TIMO	chr14	qC2	54502028	54797644	0	-0,7775
			chr17	qA3.3 - qE5	30717363	95235265	0	-0,631295
			chr19	qC1	32530562	32876274	0	-2,655926
			chr5	qA1 - qG3	3246809	152489988	0,547978	0
			chr6	qB1	40842221	41174693	0	-0,733367
			chr10	trisomía visul				
	7	BAZO	chr12	qA1.1 - qF2	3102341	121241789	0,410884	0
			chr14	qC2	54390811	54797644	0	-0,657359
			chr15	qD1	59953775	61838071	1,715223	0
			chr4	qD1 - qE2	115463074	155592637	0,322509	0
			chr6	qB1	41079118	41480845	0	-0,707677
	8	BAZO	chr11	qA1 - qE2	3030564	121797182	0,340404	0
			chr14	qC2	54390811	54741628	0	-0,470625
			chr15	qA1 - qF3	3197700	103432967	0,383428	0
			chr3	posible trisomía en mosaico				
			chr5	posible trisomía en mosaico				
	9	BAZO	chr13	qA1 - qD2.3	3004589	120236083	0	-0,306839
			chr14	qC2	53758870	54818732	0	-0,703082
			chr18	posible monosomía en mosaico				
			chr8	posible monosomía en mosaico				
			chr3	posible monosomía en mosaico				
			chr2	reordenamiento raro en mosaico				
	10	TIMO	chr10	qC2	89349022	89411957	0	-0,848517
			chr14	qC2	53758870	54741628	0	-0,820432
			chr15	qA1 - qF3	3114599	103396750	0,415769	0
			chr19	qC1	32889870	33045159	0	-3,0488000
			chr19	qC2	36991043	37039665	0,892289	0
			chr19	qC2	37318431	37439992	1,006398	0
			chr3	qA1	3755880	4968749	0,389179	0
			chr6	qB1	41079118	41474427	0	-0,791348

p53 ^{-/-}	11	TIMO	chr1	qA1 - qH6	3050442	197047560	0,511933	0
			chr14	qA1 - qE5	8668412	54455311	0,518692	0
			chr14	qA1 - qE5	54779955	123807711	0,518692	0
			chr14	qC2	54455311	54779955	0	-2,646538
			chr15	qA1 - qF3	3230186	103379327	0,742376	0
			chr16	qB5 - qC4	46385535	98215143	1,251238	0
			chr4	qA1 - qD2.2	3495085	123127296	0,526834	0
			chr5	qA1 - qF	3324972	114255093	0,515759	0
			chr6	qB1	40842221	41480845	0	-3
			chr9	qA1	4994320	5352697	1,501460	0
	12	TIMO	chr14	qC2	54219839	54797644	0	-1,06372
			chr19	qC2	36991043	37039665	0	-1,04066
			chr19	qC2	37304280	37439992	0	-0,980538
			chr6	qB1	41079118	41480845	0	-1,29872
			chr6	qB3	60634325	60968488	0,879204	0
	13	TIMO	chr11	qB4	70989662	71086419	1,261068	0
			chr14	qA1 - qE5	8588857	54219839	0,405996	0
			chr14	qC2	54219839	54741628	0	-0,588871
			chr14	qC2 - qD3	54741628	80535966	0,497123	0
			chr14	qC2 - qD3	54741628	80535966	0,497123	0
			chr19	qA - qD3	3159609	61268627	0	-0,478572
			chr2	qA1 - qA3	3031161	26332937	0,791788	0
			chr4	qD1 - qE2	115630102	155582944	0,350889	0
			chr6	qB1	41004002	41265695	0	-0,916719
			chr9	qE3.3 - qF4	96781066	124021175	0	-0,334522
			chr12	posible monosomía				
			chr13	posible monosomía				
			chr18	posible monosomía				
			chr1	posible trisomía				
	14	TIMO	chr12	qA1.1 - qF2	5251227	121241789	0	-0,517907
			chr14	qC2	53758870	54797644	0	-0,863599
			chr16	qA1 - qB3	3284325	35964907	0	-0,710414
			chr19	qA - qD3	3159609	61310293	0	-0,702248
			chr19	qC1	32779300	33232542	0	-2,77704
			chr2	qA1 - qH4	3010101	181702380	0	-0,310276
			chr3	qA1 - qH4	2999829	159587309	0	-0,31734
			chr6	qB1	41009873	41337608	0	-0,850616
			chr6	qB3	60634325	60968488	0,8912	0
			chr7	qA1 - qD3	3131459	87534305	0	-0,804651
			chr9					
	15	TIMO	chr10	qC1	79855069	80156089	0	-0,713225
			chr10	qC2	93491848	94122706	0	-0,465127
			chr11	qB4	70989662	71107244	0	-3,655408
			chr11	qE1	106802877	107052167	0	-0,314982
			chr13	qB3	61743512	62048147	0	-2,366370
			chr13	qD1	101024817	101110985	1,325319	0
			chr14	qC2	54584233	54741628	0	-3,254952
			chr16	qC4	91926157	98263853	0,502947	0
			chr17	qE4	84561754	84867030	0	-0,558769
			chr19	qC1	32530562	33207528	0	-0,752565
			chr5	qA1 - qG3	3246809	152489988	0,56532	0
			chr6	qB1	41101304	41480845	0	-2,912027
			chr6	qB3	60634325	60968488	0,981031	0
			chrX	qA1.1 - qF5	4989984	166404252	0,478654	0

continúa →

p53 ^{-/-}	16	TIMO	chr13	qA1 - qD2.3	3125139	120264684	0	-0,669203
			chr14	qC2	53966007	54810615	0	-1,926960
			chr18	qA1 - qE4	3247546	90379257	0	-0,465479
			chr2	qA1 - qB	3010101	38840981	0,367827	0
			chr3	qA1 - qH4	2999829	159197729	0	-0,339464
			chr6	qB1	41018189	41480845	0	-0,611166
			chr8	qA1.1 - qE2	3130623	131604859	0	-0,610062
			chr16	posible monosomía				
			chr1	posible monosomía				
			chr15	posible trisomía				
			chr9	posible trisomía				
			chr2	monosomía				
	17	TIMO	chr1	qA1 - qH6	3017093	197141847	0,371883	0
			chr10	qA1 - qD3	3014478	129947531	0,534352	0
			chr11	qA1	3030564	3107205	0,649209	0
			chr11	qB1.3 - qE2	52161031	121764335	0,53389	0
			chr12	qA1.1 - qF2	3102341	121241789	0,525363	0
			chr13	qB3	61743512	62048147	0,867701	0
			chr14	qA1 - qE5	8526143	125143278	0,906853	0
			chr14	qC2	53966007	54779955	0	-0,321489
			chr15	qA1 - qF3	3114599	103432967	0,699289	0
			chr16	qA1	4207487	4586276	0	-2,956471
			chr16	qB1 - qC4	20655035	98263853	0,424673	0
			chr18	qA1 - qD1	3146804	49844415	0,525395	0
			chr19	qC1	32719604	32972034	0	-0,578025
			chr2	qA1 - qH4	3010101	181702380	0,39319	0
			chr4	qA1 - qE2	3159338	155607173	0,743509	0
			chr5	qA1 - qG3	3246809	152489988	0,521744	0
			chr6	qB1	41079118	41480845	0	-0,808934
			chr8	qA1.1 - qE2	3130623	131708689	0,479431	0
			chr9	qA1 - qD	3046325	71705531	0,506653	0
			chrX	qA1.1 - qF5	4989984	166413021	0,921673	0

Genotipo	ratón	LINFOMA	Cromosoma	Citobanda	Inicio	Fin	
$\mu^{-/-}$ p53 $^{-/-}$	BCG23	BAZO	chr6	qB3	60634325	60968488	
	BCH66	GANGLIO	chr11	qD	100269226	100586134	
			chr13	qA3.3 - qD2.3	38337770	120264684	
			chr14	qC2	54156127	54810615	
			chr17	qB1 - qE5	36115249	95235265	
			chr5	qG1.2 - qG1.3	127470755	129410634	
			chr5	qG1.3	129439155	130864918	
			chr5	qG2	137958890	138649270	
			chr5	qG3	149561361	151342754	
			chr5	qG3	151362858	152489988	
			chr6	qB1	41101304	41480845	
			chr3	posible momosomía			
			BCE13	TIMO	chr19	qA - qD3	3159609
	chr12	posible momosomía					
	BCE88	TIMO	chr11				
			chr17	qD - qE1.1	57642598	94961561	
			chr19	qC1 - qD3	32573989	61310293	
			chr5	qA3 - qG3	19422781	152489988	
			chrX	qA1.1 - qF5	4989984	166316423	
	BCF78	TIMO	chr1	qE3	127643742	127687884	
			chr1	qE4	133162743	133206810	
			chr11	qA4 - qE2	33595717	121710057	
			chr14	qC2	54390811	54574177	
			chr15	qA1 - qF3	3197700	103432967	
			chr19	qC1	32845066	33113561	
			chr3	qG3	130904009	131043407	
			chr5	qA1 - qG3	3324972	152489988	
			chr6	qB1	41018189	41480845	
			chr7	qF3	133880330	135007688	
			chr9	qC	66638734	67178016	
			chr19	delección terminal visual			
			BCG13	TIMO	chr14	qC2	54502028
	chr17	qA3.3 - qE5			30717363	95235265	
	chr19	qC1			32530562	32876274	
	chr5	qA1 - qG3			3246809	152489988	
	chr6	qB1			40842221	41174693	
	TRISOMIA VISUAL 10						
	BCH65	BAZO	chr12	qA1.1 - qF2	3102341	121241789	
			chr14	qC2	54390811	54797644	
			chr15	qD1	59953775	61838071	
			chr4	qD1 - qE2	115463074	155592637	
			chr6	qB1	41079118	41480845	
	BCI18	BAZO	chr11	qA1 - qE2	3030564	121797182	
			chr14	qC2	54390811	54741628	
			chr15	qA1 - qF3	3197700	103432967	
	POSIBLE TRI3 y TRI5 EN MOSAICO						
	BCJ44	BAZO	chr13	qA1 - qD2.3	3004589	120236083	
			chr14	qC2	53758870	54818732	
	POSIBLE MONOSIMIA 18 EN MOSAICO						
	POSIBLE MONOSOMIA 8 EN MOSAICO						
	POSIBLE MONOSOMIA CROMSOMA 3 EN MOSAICO						
	REORDENAMIENTO RARO CROMOSOMA 2 EN MOSAICO						
	BCB31	TIMO	chr10	qC2	89349022	89411957	
			chr14	qC2	53758870	54741628	

		chr15	qA1 - qF3	3114599	103396750
		chr19	qC1	32889870	33045159
		chr19	qC2	36991043	37039665
		chr19	qC2	37318431	37439992
		chr3	qA1	3755880	4968749
		chr6	qB1	41079118	41474427
BCG52	TIMO	chr1	qA1 - qH6	3050442	197047560
		chr14	qA1 - qE5	8668412	54455311
		chr14	qA1 - qE5	54779955	123807711
		chr14	qC2	54455311	54779955
		chr15	qA1 - qF3	3230186	103379327
		chr16	qB5 - qC4	46385535	98215143
		chr4	qA1 - qD2.2	3495085	123127296
		chr5	qA1 - qF	3324972	114255093
		chr6	qB1	40842221	41480845
		chr9	qA1	4994320	5352697
BCH3	TIMO	chr14	qC2	54219839	54797644
		chr19	qC2	36991043	37039665
		chr19	qC2	37304280	37439992
		chr6	qB1	41079118	41480845
		chr6	qB3	60634325	60968488
BCH51	TIMO	chr11	qB4	70989662	71086419
		chr14	qA1 - qE5	8588857	54219839
		chr14	qC2	54219839	54741628
		chr14	qC2 - qD3	54741628	80535966
		chr14	qC2 - qD3	54741628	80535966
		chr19	qA - qD3	3159609	61268627
		chr2	qA1 - qA3	3031161	26332937
		chr4	qD1 - qE2	115630102	155582944
		chr6	qB1	41004002	41265695
		chr9	qE3.3 - qF4	96781066	124021175
POSIBLE MONOSOMIA 12					
POSIBLE MONOSOMIA 13					
POSIBLE MONOSOMIA 18					
POSIBLE TRISOMIA 1					
BCH53	TIMO	chr12	qA1.1 - qF2	5251227	121241789
		chr14	qC2	53758870	54797644
		chr16	qA1 - qB3	3284325	35964907
		chr19	qA - qD3	3159609	61310293
		chr19	qC1	32779300	33232542
		chr2	qA1 - qH4	3010101	181702380
		chr3	qA1 - qH4	2999829	159587309
		chr6	qB1	41009873	41337608
		chr6	qB3	60634325	60968488
		chr7	qA1 - qD3	3131459	87534305
POSIBLE MONOSOMIA 9					
CJ3	TIMO	chr10	qC1	79855069	80156089
		chr10	qC2	93491848	94122706
		chr11	qB4	70989662	71107244
		chr11	qE1	106802877	107052167
		chr13	qB3	61743512	62048147
		chr13	qD1	101024817	101110985
		chr14	qC2	54584233	54741628
		chr16	qC4	91926157	98263853
		chr17	qE4	84561754	84867030

		chr19	qC1	32530562	33207528
		chr5	qA1 - qG3	3246809	152489988
		chr6	qB1	41101304	41480845
		chr6	qB3	60634325	60968488
		chrX	qA1.1 - qF5	4989984	166404252
BCJ44	TIMO	chr13	qA1 - qD2.3	3125139	120264684
		chr14	qC2	53966007	54810615
		chr18	qA1 - qE4	3247546	90379257
		chr2	qA1 - qB	3010101	38840981
		chr3	qA1 - qH4	2999829	159197729
		chr6	qB1	41018189	41480845
		chr8	qA1.1 - qE2	3130623	131604859
POSIBLE MONOSOMIA 16					
POSIBLE MONOSOMIA CROMOSOMA 1					
POSIBLE TRISOMIA 15					
POSIBLE TRISOMIA 9					
RESTO CROMOSOMA 2 MONOSOMICO					
BM1	TIMO	chr1	qA1 - qH6	3017093	197141847
		chr10	qA1 - qD3	3014478	129947531
		chr11	qA1	3030564	3107205
		chr11	qB1.3 - qE2	52161031	121764335
		chr12	qA1.1 - qF2	3102341	121241789
		chr13	qB3	61743512	62048147
		chr14	qA1 - qE5	8526143	125143278
		chr14	qC2	53966007	54779955
		chr15	qA1 - qF3	3114599	103432967
		chr16	qA1	4207487	4586276
		chr16	qB1 - qC4	20655035	98263853
		chr18	qA1 - qD1	3146804	49844415
		chr19	qC1	32719604	32972034
		chr2	qA1 - qH4	3010101	181702380
		chr4	qA1 - qE2	3159338	155607173
		chr5	qA1 - qG3	3246809	152489988
		chr6	qB1	41079118	41480845
		chr8	qA1.1 - qE2	3130623	131708689
		chr9	qA1 - qD	3046325	71705531
		chrX	qA1.1 - qF5	4989984	166413021

Tipo	Amplificación	Deleción
Delecion	0	-0,910548
Delecion	0	-0,395128
Delecion	0	-0,511249
Del Hom	0	-1,483926
Duplicacion	0,413306	0
Delecion	0	-0,618106
Duplicacion	0,473761	0
Duplicacion	0,83445	0
Duplicacion	0,458842	0
Delecion	0	-0,629755
Delecion	0	-0,647123
Monosomía		
Monosomía	0	-0,732115
Monosomía		
Trisomía		
Delecion	0	-1,025389
Delecion	0	-0,69645
Trisomía	0,324196	0
Monosomía	0	-0,348007
Delecion	0	-0,686763
Delecion	0	-0,706442
Duplicacion	0,330363	0
Del Hom	0	-0,856662
Trisomía	0,338664	0
Del Hom	0	-2,528168
Duplicacion	0,613065	0
Trisomía	0,485799	0
Delecion	0	-0,781543
Delecion	0	-0,665314
Duplicacion	0,588604	0
Delecion	0	-0,7775
Delecion	0	-0,631295
Del Hom	0	-2,655926
Trisomía	0,547978	0
Del Hom	0	-0,733367
Trisomía		
Trisomía	0,410884	0
Delecion	0	-0,657359
Amplicón	1,715223	0
Duplicacion	0,322509	0
Delecion	0	-0,707677
Trisomía	0,340404	0
Delecion	0	-0,470625
Trisomía	0,383428	0
Trisomía		
Monosomía	0	-0,306839
Delecion	0	-0,703082
Monosomía		
Monosomía		
Monosomía		
Dup/Del		
Delecion	0	-0,848517
Del Hom	0	-0,820432

Trisomía	0,415769	0
Del Hom	0	-3,0488000
Duplicacion	0,892289	0
Duplicacion	1,006398	0
Duplicacion	0,389179	0
Delecion	0	-0,791348
Trisomía	0,511933	0
Trisomía	0,518692	0
Trisomía	0,518692	0
Del Hom	0	-2,646538
Trisomía	0,742376	0
Amplicón	1,251238	0
Trisomía	0,526834	0
Duplicacion	0,515759	0
Delecion	0	-3
Duplicacion	1,501460	0
Delecion	0	-1,06372
Delecion	0	-1,04066
Delecion	0	-0,980538
Delecion	0	-1,29872
Duplicacion	0,879204	0
Duplicacion	1,261068	0
Trisomía	0,405996	0
Del Hom	0	-0,588871
Trisomía	0,497123	0
Trisomía	0,497123	0
Monosomía	0	-0,478572
Amplicon	0,791788	0
Duplicacion	0,350889	0
Del Hom	0	-0,916719
Delecion	0	-0,334522
Monosomía		
Monosomía		
Monosomía		
Trisomía		
Trisomía	0	-0,517907
Del Hom	0	-0,863599
Delecion	0	-0,710414
Delecion	0	-0,702248
Del Hom	0	-2,77704
Monosomía	0	-0,310276
Monosomía	0	-0,31734
Del Hom	0	-0,850616
Duplicacion	0,8912	0
Delecion	0	-0,804651
Monosomía		
Delecion	0	-0,713225
Delecion	0	-0,465127
Del Hom	0	-3,655408
Delecion	0	-0,314982
Del Hom	0	-2,366370
Duplicacion	1,325319	0
Del Hom	0	-3,254952
Duplicacion	0,502947	0
Delecion	0	-0,558769

om (previa posit	0	-0,752565
Trisomía	0,56532	0
Del Hom	0	-2,912027
Duplicacion	0,981031	0
Trisomía	0,478654	0
Monosomía	0	-0,669203
Del Hom	0	-1,926960
Monosomía	0	-0,465479
Duplicacion	0,367827	0
Monosomía	0	-0,339464
Delecion	0	-0,611166
Monosomía	0	-0,610062
Monosomía		
Trisomía		
Trisomía		
Delecion		
Trisomía	0,371883	0
Trisomía	0,534352	0
Duplicacion	0,649209	0
Duplicacion	0,53389	0
Trisomía	0,525363	0
Duplicacion	0,867701	0
Trisomía	0,906853	0
Del Hom	0	-0,321489
Trisomía	0,699289	0
Del Hom	0	-2,956471
Duplicacion	0,424673	0
Duplicacion	0,525395	0
Delecion	0	-0,578025
Trisomía	0,39319	0
Trisomía	0,743509	0
Trisomía	0,521744	0
Del Hom	0	-0,808934
Trisomía	0,479431	0
Duplicacion	0,506653	0
Trisomía	0,921673	0

Publicaciones